

SÉRIE A, N° 1329
N° D'ORDRE : 2198

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Albert CRÉPIN

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR LA NUTRITION MINÉRALE DU
« STERIGMATOCYSTIS NIGRA ».

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 28/4 1932, devant la Commission d'examen.

Président : MM. MOLLIARD
Examineurs } DEREIMS
LAUGIER

PARIS
IMPRIMERIE LOUIS CLERCX
4 bis, RUE NOBEL

1932

SÉRIE A, N° 1329
N° D'ORDRE : 2198

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Albert CRÉPIN

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR LA NUTRITION MINÉRALE DU
« STERIGMATOCYSTIS NIGRA ».

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1932, devant la Commission d'examen.

Président : MM. MOLLIARD
Examineurs { DEREIMS
LAUGIER

PARIS
IMPRIMERIE LOUIS CLERCX
4 bis, RUE NOBEL

1932

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen.	MM.
Doyen honoraire.	C. MAURAIN, Professeur, Physique du globe.
	M. MOLLIARD.
	H. LE CHATELIER.
	H. LEBESGUE.
	A. FERNBACH.
	A. LEDUC.
	E. HÉROUARD.
	ÉMILE PICARD.
	Rémy PERRIER.

Professeurs honoraires

E. GOURSAT.	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
N.	Mécanique physique et expérimentale.
P. JANET.	Electrotechnique générale.
F. WALLERANT.	Minéralogie.
P. PAINLEVÉ.	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M. CAULLERY.	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Emile BOREL.	Calcul des probabilités et Physique mathém.
H. ABRAHAM.	Physique.
M. MOLLIARD.	Physiologie végétale.
E. CARTAN.	Géométrie supérieure.
Gabriel BERTRAND.	Chimie biologique.
Jean PERRIN.	Chimie physique.
L. LAPICQUE.	Physiologie générale.
M ^{me} P. CURIE.	Physique générale et radioactivité.
G. URBAIN.	Chimie générale.
L. MARCHIS.	Aviation.
E. VESSIOT.	Théorie des fonctions et théorie des transformat.
A. COTTON.	Physique générale.
J. DRACH.	Application de l'analyse à la géométrie.
Charles FABRY.	Physique.
R. LESPIEAU.	Théories chimiques.
P. PORTIER.	Physiologie comparée.
Charles PÉREZ.	Zoologie.
E. BLAISE.	Chimie organique.
P.-A. DANGEARD.	Botanique.
Léon BERTRAND.	Géologie structurale et géologie appliquée.
E. RABAUD.	Biologie expérimentale.
G. JULIA.	Calcul différentiel et calcul intégral.
Paul MONTEL.	Mécanique rationnelle.
V. AUGER.	Chimie appliquée.
P. WINTREBERT.	Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSCQ.	Biologie maritime.
Eugène BLOCH.	Physique théorique et physique céleste.
A. MAILHE.	Etude des combustibles.
L. LUTAUD.	Géographie physique et géologie dynamique.
Henri VILLAT.	Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB.	Géologie.
P. PASCAL.	Chimie minérale.
Léon BRILLOUIN.	Théories physiques.
E. F. SCLANGON.	Astronomie.
H. BÉNARD.	Mécanique expérimentale des fluides.
C. MAUGUIN.	Minéralogie.
L. BLARINGHEM.	Botanique.
A. GUILLIERMOND.	Botanique (P. C. N.).
A. DENJOY.	Mathématiques générales.
A. DUFOUR.	Physique (P. C. N.).

Professeurs.



E. PÉCHARD.	Chimie (Enst P.C.N.).	L. JOLEAUD.	Paléontologie.
A. GUILLET.	Physique.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	Chimie organique.
M. GUICHARD.	Chimie minérale.	BÉGHIN.	Méc. théor. des fluides.
A. MICHEL-LÉVY.	Pétrographie.	FOCH.	Méc. expér. des fluides.
A. DEREIMS.	Géologie.	PAUTHENIER.	Physique (P. C. N.).
H. MOUTON.	Chimie physique.	VILLEY.	Méc. phys. et expér.
L. DUNOYER.	Optique appliquée.	DE BROGLIE.	Théories physiques.
M. JAVILLIER.	Chimie biologique.	LABROUSTE.	Physique du Globe.
ROBERT-LÉVY.	Zoologie.	FREUNDLER.	Chimie (P. C. N.).
A. DEBIERNE.	Radioactivité.	PRENANT.	Zoologie.
E. DARMOIS.	Physique.	P. JOB.	Chimie générale.
G. BRUHAT.	Physique.	CHRÉTIEN.	Optique appliquée.
F. PICARD.	Zoologie (Ev. des êtres organ.).	BOHN.	Zoologie (P. C. N.).
M. FRÉCHET.	Calcul des Probabil. et Physique mathémat.	BOURGUEL.	Chimie (P. C. N.).
		COMBES.	Sciences nat. (P.C.N.)
		GARNIER.	Mécanique rationnelle.

Secrétaire.

A. PACAUD.

A MES MAITRES

Au Professeur MOLLIARD

Membre de l'Institut,
Professeur de Physiologie Végétale à la Sorbonne.

*Hommage de respectueuse reconnaissance
et d'affectueux dévouement.*

A Monsieur R. COMBES

Professeur à la Sorbonne.

Témoignage de sincère affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR LA NUTRITION MINÉRALE DU « STERIGMATOCYSTIS NIGRA »

INTRODUCTION

Le rôle important que jouent les substances minérales dans la nutrition des végétaux est soupçonné depuis longtemps. Dès le XVI^e siècle, BERNARD PALISSY émet l'idée que les « sels végétatifs » sont la partie essentielle de l'engrais. « Si quelqu'un sème un champ plusieurs années sans le fumer, dit-il, les semences tireront le sel de la terre pour leur accroissement, et la terre, par ce moyen, se trouvera dénuée de sels et ne pourra plus produire ». On s'attendait donc à ce que la nutrition minérale ait préoccupé les savants; et cependant, il s'écoulera plusieurs siècles avant que la question soit reprise par LAVOISIER, puis par DE SAUSSURE (1804) et LIEBIG (1840).

LIEBIG formule la loi du minimum selon laquelle, pour permettre la récolte d'une plante, chaque substance nutritive doit se trouver dans le sol suivant une proportion minimum. Si ce minimum n'est pas atteint, la récolte est faible ou nulle, quelles que soient les proportions des autres éléments.

A partir de cette époque, les travaux concernant la nutrition minérale des plantes sont très nombreux, mais ils intéressent surtout les plantes supérieures et leur utilisation agricole.

RAULIN (82), dont les travaux sont devenus classiques, reprend la question de la nutrition minérale en s'adressant aux végétaux inférieurs. Il emploie la méthode synthétique en constituant des milieux de culture liquides dont il fait varier à volonté la composition et sur lesquels il cultive le *Sterigmatocystis nigra*. L'adjonction ou la suppression de l'un ou l'autre des éléments minéraux du milieu provoque des modifications dans le poids des récoltes, modifications qui renseignent sur l'importance physiologique de l'élément minéral considéré.

D'une façon générale, les auteurs qui ont succédé à RAULIN ont, comme lui, procédé par synthèse. Après avoir constitué un milieu type, analogue au milieu de RAULIN, ils introduisent dans ce milieu l'élément à étudier et tirent leurs conclusions de la pesée du mycelium.

En vue de préciser, en les complétant, les résultats précédemment obtenus, nous avons cultivé le *Sterigmatocystis nigra* sur un milieu synthétique de notre choix. Puis nous avons analysé le mycelium recueilli à des intervalles de temps convenables, ce qui nous permet de suivre pas à pas les variations de la composition minérale du champignon. De plus, nous avons analysé comparativement les résidus de la destruction du mycelium et de la destruction du milieu sur lequel le *Sterigmatocystis nigra* s'était développé. A part les différences inévitables dues à l'imperfection des méthodes d'ana-

lyse, le total des quantités trouvées dans les deux séries de dosage doit, pour chaque élément, restituer la quantité placée dans la solution utilisée comme milieu de culture. En un mot, nous sommes en mesure d'établir le bilan des substances minérales pour chaque stade de l'évolution de *Sterigmatocystis nigra*.

Ce moyen permet de contrôler pas à pas les recherches et de déceler immédiatement les erreurs provenant des méthodes de destruction de la matière organique et des procédés utilisés pour l'analyse du résidu minéral.

De plus, il s'offre là une excellente occasion d'éprouver la valeur des différentes techniques de minéralisation. Le milieu de culture est en effet très riche en sucre ; d'autre part, les graisses et matières résineuses, assez abondantes dans le mycelium, présentent de sérieuses difficultés de destruction. De plus, on se trouve en présence d'acides organiques, l'acide tartrique en particulier, dont l'élimination n'est pas toujours facile et qui influent de façon assez fâcheuse au cours de certains dosages.

La condition de tenir compte d'une façon permanente de l'erreur absolue nous étant imposée, nous avons été contraint d'étudier de très près les méthodes auxquelles nous avons eu recours. On nous excusera donc si, au cours de notre travail, nous donnons à la partie technique un développement qui semblerait exagéré.

Notre but a été d'étudier l'influence de l'acidité sur la nutrition minérale.

OSTERHOUT (79), en 1914, met en évidence la diffi-

culté de pénétration des sels dans le protoplasme quand le milieu devient acide.

MOLLIARD (66) observe que sur milieu acide, la teneur en cendres du *Sterigmatocystis nigra* devient très faible et constate (67) que l'appauvrissement du mycelium en substances minérales provient en grande partie d'une diminution du potassium et du magnésium.

LOEB (61) et GIRARD (44) étudient l'influence de l'état électrique de la paroi cellulaire sur sa perméabilité à un ion donné.

GÉNAUD (41) observe le déplacement de certains ions par d'autres, en particulier le déplacement de l'ion potassium par l'ion ammonium. Il est probable qu'un milieu acide, abondamment pourvu d'ions H dont la mobilité est très grande, possède une activité considérable vis-à-vis de ces phénomènes de déplacement d'ions.

LE RENARD (58) cependant, et KIESEL (52) montrent que l'action des acides n'est pas seulement fonction du nombre des ions H; certains acides gras, fort peu dissociés, se montrent très toxiques.

Au cours de nos recherches, nous avons utilisé l'acide chlorhydrique dont la dissociation est très grande, et nous l'avons employé soit pur, soit sous forme de chlorure d'ammonium. Notre étude a été conduite de la façon suivante :

Nous avons cultivé le *Sterigmatocystis nigra* sur un milieu à réaction presque neutre pendant une période s'étendant du semis à un stade assez avancé de la sporulation, où le champignon se trouve en autolyse très nette.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux

de cultures faites sur milieu au chlorure d'ammonium. Le champignon absorbant l'ion ammonium, l'acide chlorhydrique non utilisé s'accumule dans la solution, modifiant de façon très considérable la réaction du milieu.

De plus, pour éviter l'accoutumance capable de masquer, sur milieu au chlorure d'ammonium, l'action de l'acide sur le *Sterigmatocystis nigra*, nous avons placé brutalement le champignon, élevé sur milieu au tartrate d'ammonium, en présence de doses massives d'acide chlorhydrique afin de voir quelle serait la réaction du *Sterigmatocystis nigra* vis-à-vis de cette acidité.

Nous exposerons en premier lieu les méthodes de culture et de récolte du *Sterigmatocystis nigra*. Puis nous examinerons les moyens utilisés pour éliminer les substances organiques et obtenir le complexe minéral destiné à l'analyse. Ensuite nous passerons en revue les méthodes mises en œuvre pour le dosage du soufre, du phosphore, du potassium et du magnésium.

Nous aborderons alors l'étude de la nutrition minérale du *Sterigmatocystis nigra* d'abord sur milieu peu acide, au tartrate d'ammonium, ensuite sur milieu au chlorure d'ammonium, à réaction progressivement acide.

Nous suivrons l'évolution du phosphore dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium recevant, à 24 heures, des doses variées d'acide chlorhydrique.

Nous nous efforcerons enfin de voir comment l'acidité du milieu agit sur le métabolisme des substances minérales.

Le présent travail a été effectué au Laboratoire de Physiologie Végétale de la Sorbonne. Nous prions

M. le Professeur MOLLIARD d'agréer l'expression de notre affection et de notre respectueuse reconnaissance pour son inépuisable bienveillance et pour les conseils qu'il nous a prodigués.

Une très ancienne amitié nous lie à M. COMBES, Professeur à la Sorbonne, qui a été notre initiateur en Physiologie Végétale. Nous voulons le remercier ici de ses nombreux encouragements et de l'aide qu'il nous a prêtée en tant de circonstances difficiles.

Nous avons profité bien souvent des avis éclairés de M. MICHEL-DURAND, Directeur-adjoint du Laboratoire de Biologie végétale de Fontainebleau; nous le prions d'agréer nos bien vifs remerciements.

Notre étude a été féconde en embûches : c'est assez dire combien nous a été précieux le secours de nos camarades de laboratoire qui ont mis sans compter à notre disposition leur érudition et leur expérience. A regret, nous ne pouvons les nommer tous, et nous les prions de trouver ici l'expression de notre gratitude.

Nous tenons à remercier d'une façon très particulière notre ami ECHEVIN qui, sans souci de peine ni de temps, a revu et mis au point avec nous la rédaction de notre mémoire.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES DE CULTURE ET DE RÉCOLTE

DU « STERIGMATOCYTIS NIGRA »

a) CULTURE. — Nous avons employé deux types de solutions nutritives. Dans le premier, c'est le tartrate d'ammonium qui fournit l'azote nécessaire au développement du champignon. Voici la formule de ce liquide que nous dénommons milieu normal :

Saccharose	46,660 gr.
Tartrate neutre d'ammonium	9,200 gr.
Sulfate de magnésium cristallisé	0,400 gr.
Sulfate ferreux sec	0,023 gr.
Sulfate de zinc cristallisé	0,046 gr.
Phosphate monopotassique	0,950 gr.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 c.c.

Pour effectuer des cultures sur milieu à réaction acide, la source d'azote est le chlorure d'ammonium

utilisé de telle sorte que le rapport $\frac{\text{azote}}{\text{carbone}}$ reste le

même que dans le milieu au tartrate. La solution présente la formule ci-après :

Saccharose	46,660 gr.
Chlorure d'ammonium	4,778 gr.
Sulfate de magnésium cristallisé	0,400 gr.
Sulfate ferreux sec	0,023 gr.
Sulfate de zinc cristallisé	0,046 gr.
Phosphate monopotassique	0,950 gr.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 c.c.

La solution nutritive est placée dans des fioles coniques de 1.000 c.c. à raison de 150 c.c. par flacon.

Après stérilisation, le milieu est ensemencé de spores de *Sterigmatocystis* prélevées au moyen d'une palette métallique pour que la quantité de spores reçue par chaque flacon soit à peu près uniforme.

Les flacons sont alors placés à l'étuve à 35° jusqu'au moment de la récolte.

La germination est rapide. A 24 heures, toute la surface du liquide est recouverte d'un voile mycélien généralement continu. A 32 heures, le mycelium a l'aspect d'une croute homogène non interrompue. Certaines cultures à ce stade peuvent présenter des lacunes : ce sont des cultures anormales qu'il faut rejeter si l'on désire des résultats concordants. La sporulation, sur milieu normal, débute vers 48 heures et devient très intense vers 72 heures. Puis l'autolyse se produit, le liquide de culture brunit, et, vers 120 heures, le mycelium présente une consistance un peu gélatineuse. C'est à ce stade que nous avons arrêté nos expériences sur milieu normal. Nous les avons également limitées à la même période de temps sur milieu au chlorure d'ammonium bien que l'absence de sporulation et le ralentissement de l'autolyse rendent beaucoup moins nets les phénomènes biologiques du *Sterigmatocystis nigra*.

Pour la préparation du milieu de culture, tous les produits utilisés ont été examinés au point de vue des éléments qui font l'objet de la présente étude. De plus, nous en avons fait une provision suffisante pour n'avoir pas à changer de produit au cours du travail. Nous avons effectué la même vérification, absolument indis-

pensable, pour tous les réactifs utilisés soit pour les destructions, soit pour les dosages, et il nous est arrivé de devoir rejeter, à cause de leur teneur en soufre, certains lots d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique garantis purs.

b) RÉCOLTE. — Le moment venu, le contenu de chaque fiole est renversé sur un linge fin qui retient le mycelium. L'acidité du liquide est immédiatement dosée. Le mycelium est lavé et exprimé trois fois, les eaux de lavage étant jointes au liquide précédent.

Ceci fait, le mycelium est recueilli dans une petite capsule de porcelaine, mis à l'étuve à 90° jusqu'à dessiccation complète, obtenue généralement après un séjour de 24 heures. Une pesée détermine alors le poids de substance sèche de la culture.

Nous nous trouvons donc en possession des deux éléments, mycelium sec et liquide de culture, sur lesquels nous aurons à pratiquer une série de dosages après avoir au préalable éliminé la substance organique.

Nous insistons sur la nécessité de pratiquer sur une même série de cultures toute la série des dosages utilisés pour l'établissement de la courbe d'absorption d'une substance donnée au cours du développement de *Sterigmatocystis nigra*. Il est extrêmement difficile, en raison de la sensibilité du champignon, de réaliser des conditions d'expérience absolument identiques, et si différentes séries, prises en bloc, sont comparables entre elles, il n'en est pas de même si l'on veut comparer deux cultures de même âge provenant de deux séries différentes.

Pour cela, nos séries de cultures comportaient quarante à cinquante fioles coniques, remplies du même liquide nutritif,ensemencées au même moment au moyen de spores prélevées sur une unique souche. En prélevant les spores sur plusieurs souches différentes, les résultats cessent d'être concordants. A partir de ce départ commun, les récoltes étaient espacées dans la mesure voulue pour notre étude.

CHAPITRE II

MINÉRALISATION DE LA SUBSTANCE ORGANIQUE

Les procédés de destruction de la substance organique ne manquent pas. Aucun n'est parfait, et le choix dépend évidemment du but poursuivi puisqu'il s'agit, non seulement d'éliminer le carbone et d'amener le résidu à son maximum d'oxydation, mais aussi et surtout de fixer les éléments volatils destinés à l'analyse.

Pouvant obtenir à volonté du *Sterigmatocystis*, nous avons donné la préférence aux méthodes de macro-analyse, et nous avons cherché un mode de destruction capable d'oxyder la plus forte quantité possible de substance organique. Nous voulions en effet, pour rendre les résultats plus homogènes, effectuer sur un seul lot de résidu minéral le dosage des différents éléments dont nous étudions la variation. Ce but n'a pas été toujours atteint, car l'expérience a établi que le maximum de matière organique à détruire en une seule fois ne pouvait dépasser quatre grammes.

Parmi les substances à doser, le soufre est certainement celle qui présente à l'analyse le plus de difficulté. Il en résulte que le problème s'est trouvé ramené à détruire le plus de substance organique possible, sans perte de soufre, et en évitant d'introduire dans le pro-

duit à analyser une grande quantité de substance étrangère.

La minéralisation des composés organiques peut s'effectuer par voie sèche, par voie humide, ou par la combinaison de ces deux moyens.

L'incinération est le procédé de destruction le plus simple, mais aussi le plus défectueux, dans le cas où nous nous trouvons placés. Les pertes de soufre, assez réduites si l'on opère très prudemment, peuvent selon GAROLA (39) atteindre 30 p. 100 et même 50 p. 100 suivant SILBERSTEIN (87). Différents auteurs, pour améliorer la méthode, brûlent la substance en présence de sels variés, les uns fournissant un appoint d'oxygène, les autres destinés à fixer les produits volatils de la destruction, en particulier le soufre et le phosphore.

Toutes ces méthodes, rappelées en détail par ECHEVIN (31) ont ceci de commun qu'elles ne permettent pas d'éviter des pertes sensibles par volatilisation, et il y a toujours lieu de craindre la projection de particules du corps à détruire. Elles n'offrent, en revanche, aucun avantage de simplicité ou de gain de temps.

Pour éviter la perte des éléments volatils, certains auteurs brûlent la matière organique dans un courant d'oxygène, les gaz passant ensuite sur du carbonate de potassium : BERTHELOT et ANDRÉ (4) ; sur du bioxyde de plomb : DENNSTEDT (29), WARREN (93) ; sur un mélange de chaux et de soude : BRUGELMANN (12). Le succès ne correspond en rien à la complication de la méthode. Dans le même ordre d'idée, nous avons essayé de détruire la substance organique placée dans une nacelle en porcelaine, mise elle-même à l'intérieur d'un

tube de porcelaine sur lequel était enroulé un cordon d'amiante, et chauffé par un puissant brûleur à pétrole. Les produits de la combustion étaient reçus dans un certain nombre de flacons laveurs contenant des solutions de substances destinées à l'absorption du mélange gazeux. Dans tout l'appareil on provoquait, à la trompe, un lent courant d'oxygène. Ce dispositif nous a permis du moins de suivre le parcours des gaz de combustion et de constater que l'anhydride sulfurique traverse parfaitement sept flacons laveurs sans être complètement fixé par les solutions alcalines concentrées ou diluées qui s'y trouvent placées.

Les méthodes par voie humide présentent, elles aussi, une grande variété.

CARIUS (14) emploie l'oxydation par l'acide nitrique à température élevée, en tube scellé. Cette méthode, utilisée dans certains laboratoires, où l'on chauffe les tubes à l'intérieur d'un bloc de fonte perforé, ne se prête pas à un usage courant. FRÉSENIUS (38) propose l'emploi du chlorate de potassium en milieu chlorhydrique. Le procédé est très désagréable à cause du dégagement de chlore; de plus, il peut se produire des explosions dangereuses.

THÉNARD semble, vers 1839, avoir le premier utilisé l'action combinée de l'acide nitrique et du nitrate de potassium. ORFILA (75), en 1852, utilise la même méthode pour des recherches toxicologiques. JOULIE (51), en 1894, l'applique à la destruction des substances végétales. Avec des variantes de détail, cette méthode dite de JOULIE, est celle que nous utiliserons.

L'acide nitrique étant un oxydant relativement lent,

on a voulu activer son action par addition d'acide perchlorique : LEMATTE, BOINOT et KAHANE (57) ; par addition de perhydrol et de brôme : STOCKHOLM et KOCH (88). Nous avons obtenu, par adjonction d'acide perchlorique, des pertes en soufre de l'ordre de 16 p. 100.

Etant donné que l'obtention de résultats concordants ne constitue pas le critérium de la valeur d'une méthode, nous avons pensé avec GÉRARD (42) que l'acide perchlorique pouvait déplacer une partie de l'acide sulfurique. Pour le vérifier, nous avons mis en présence du sulfate de magnésium et un mélange d'acides nitrique et perchlorique, ce dernier représentant plus de cinquante fois le poids du sulfate employé. Nous n'avons constaté aucune perte. Rapprochant ce fait de l'évasion d'anhydride sulfurique visible quand nous détruisons la substance organique par combustion dans un tube de porcelaine suivi de flacons laveurs, nous avons acquis la conviction que la perte en soufre est due à la brutalité d'oxydation de l'acide perchlorique, alors que le soufre est encore à l'état de composés complexes et relativement instables. Ce même acide perchlorique utilisé seulement en fin de destruction pour oxyder les particules rebelles à l'action de l'acide azotique, nous a donné toute satisfaction. Notons cependant que la présence de traces de chlorates rend plus laborieuse la précipitation du soufre. Mentionnons enfin, pour n'être pas trop incomplet, les méthodes de destruction mixte, telle que celle de HENRIQUES (47) et de BERTRAND (5) qui recourent à l'action de l'acide nitrique en présence de nitrate par voie humide, puis achèvent l'oxydation par fusion en milieu alcalin. Dans notre cas, ces métho-

des offraient l'inconvénient d'introduire une masse considérable de sels alcalins gênants pour le dosage du potassium. De plus, à moins de conduire la destruction nitrique jusqu'à un point très avancé, ce qui rendait la fusion alcaline presque inutile, nous provoquions au moment de la calcination des explosions avec projection d'une forte proportion de matière.

Dans une partie de notre étude, où nous n'avons plus envisagé le dosage du soufre, nous avons donné la préférence à la méthode sulfonitrique pratiquée par MILLON (63) et reprise ensuite par NEUMANN (73).

Nous décrirons donc successivement les deux méthodes employées au cours de notre travail.

MÉTHODES EMPLOYÉES

1° MÉTHODE D'OXYDATION NITRIQUE. — Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous recueillons, d'une part, chaque mycelium, lequel est desséché à l'étuve, d'autre part, le liquide de culture correspondant. Celui-ci est additionné de 15 c.c. d'une solution à 10 p. 100 de nitrate de sodium et de 30 c.c. d'acide nitrique à 40°, puis placé au bain-marie jusqu'à complète évaporation dans un ballon à extraction de 750 c.c.

De son côté, le mycelium desséché est mis dans un ballon à extraction avec un mélange de 50 c.c. d'eau, 30 c.c. d'acide nitrique à 40° et 15 c.c. de solution de nitrate de sodium à 10 %. Le col du ballon est fermé par un entonnoir renversé et le mycelium macère à froid dans le liquide pendant 24 heures. Ensuite le ballon est porté au bain-marie bouillant pendant 12 heu-

res, après lesquelles l'entonnoir est enlevé et le contenu du ballon est évaporé à sec.

A partir de ce moment, mycelium et liquide subissent un traitement identique.

Le ballon reçoit 20 c.c. d'acide nitrique à 40°, il est fermé d'un entonnoir renversé et mis 12 heures au bain-marie. Puis l'entonnoir est enlevé et l'acide nitrique est évaporé. Le ballon est refroidi. Il reçoit une nouvelle portion d'acide nitrique. La même opération est recommencée trois fois de suite. A ce stade, le contenu du ballon a l'aspect d'une masse cristallisée fortement colorée en jaune par les matières qui ont résisté à l'oxydation.

L'acide nitrique à 40° est remplacé par de l'acide nitrique fumant pour un nouveau traitement au bain-marie. Puis, le ballon étant placé sur bain de sable à 130-150°, l'attaque par de nouvelles portions de 20 c.c. d'acide nitrique fumant continue. Il est nécessaire de surveiller l'opération et, dès que l'acide nitrique a disparu, les ballons sont enlevés du bain de sable et refroidis avant tout traitement ultérieur. On obtient finalement une masse à peu près blanche.

Pour chasser l'acide nitrique, le contenu de chaque ballon est traité à deux reprises par 25 c.c. d'acide chlorhydrique. Il ne reste plus qu'un sel blanc ou plus ou moins teinté de jaune qui, en solution légèrement chlorhydrique, fournit le produit à analyser.

Ce procédé de destruction n'est pas parfait; il est long et demande une surveillance assez serrée; il laisse subsister des traces de matière organique; il entraîne l'emploi, étant donné la masse considérable de sucre

contenu dans les cultures jeunes, d'une quantité importante d'acide nitrique; or, il est difficile d'obtenir un acide nitrique fumant bien exempt de soufre. Quoi qu'il en soit, chaque fois que nous avons voulu abréger notre travail soit par l'emploi prématuré de l'acide nitrique fumant, soit par traitement de début au bain de sable, nous avons constaté des pertes très sensibles en soufre. De même, il est indispensable de laisser refroidir complètement les ballons à extraction entre deux reprises successives par l'acide.

Avec ces réserves, ainsi que nous l'avons montré précédemment avec ECHEVIN (32) et comme en témoignent les tableaux d'analyse du présent mémoire, la destruction nitrique donne des résultats excellents pour la recherche du soufre, du phosphore, du potassium, et du magnésium. La perte en soufre est peu considérable et l'on peut doser commodément les trois autres éléments sur le produit de la destruction.

2° MÉTHODE SULFO-NITRIQUE. — Nous avons utilisé cette méthode en vue du dosage du phosphore. Elle constitue un moyen très simple et très satisfaisant de minéralisation de la substance organique. Nous avons opéré de la façon suivante : le liquide de culture, recueilli dans un ballon à extraction de 750 c.c., est additionné de 30 c.c. d'acide nitrique à 40° et évaporé à sec au bain-marie. Le résidu de l'évaporation est repris par un peu d'acide nitrique et entraîné dans un matras de Kjeldhal de 300 c.c., puis évaporé presque à sec. On ajoute alors 30 c.c. d'acide nitrique à 40°.

Le mycelium desséché et pesé est introduit directement dans un matras de 300 c.c. et traité par 30 c.c.

d'acide nitrique à 40° à froid, pendant 24 heures; le mycelium est alors complètement désagrégé.

Liquide et mycelium reçoivent 7 c.c. d'acide sulfurique. Le Kjeldhal est mis à feu doux, l'orifice du matras étant garni d'un petit entonnoir. Peu à peu, l'acide nitrique s'évapore et on le remplace, autant qu'il est nécessaire, par de nouveaux apports de 30 c.c. Le terme de l'opération est atteint quand, l'acide nitrique étant évaporé, il ne reste au fond du matras qu'une liqueur à peu près incolore émettant quelques fumées blanches d'acide sulfurique.

Nous avons utilisé ce mode de destruction en vue du dosage du phosphore par la méthode de COPAUX. Si la chauffe n'est pas brutale au début ou inutilement prolongée quand les vapeurs blanches apparaissent, on ne constate aucune perte exagérée de phosphore.

CHAPITRE III

TECHNIQUE DE DOSAGE DU SOUFRE

Dans la solution de substances minérales sur laquelle nous travaillons, le soufre se présente sous la forme de sulfates. Deux moyens sont actuellement utilisés pour insolubiliser les sulfates soit en les amenant à l'état de sulfate de benzidine, soit en les précipitant sous forme de sulfate de baryum.

La précipitation du sulfate de benzidine s'effectue dans un milieu dont le pH est compris entre 2, 5 et 3. Le réactif précipitant est constitué par du chlorydrate de benzidine en excès.

Le précipité est centrifugé ou filtré sur filtre en verre poreux d'Iéna, puis lavé au moyen d'acétone ou d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther. Le sulfate de benzidine obtenu est hydrolysé par de l'eau distillée bouillante légèrement alcalinisée par la soude N/50 en présence de phénolphtaléine; on titre par la soude l'acide sulfurique libéré. Sur des solutions de sels purs, ce mode de dosage donne des résultats excellents. Une mise au point récente en a été faite par CHATRON (16) qui a étudié également les variantes de la méthode.

La précipitation des sulfates sous forme de sulfate de baryum est le procédé classique; sous une apparence très simple, cette technique présente de réelles diffi-

cultés exposées en détail dans le manuel de TREADWELL-BOLL (91). Le sulfate de baryum obtenu est généralement pesé. Voulant éviter la pesée, différents auteurs préfèrent user d'un dosage volumétrique direct ou indirect. C'est ainsi que LE GUYON (55) place la solution à doser dans un tube de centrifugeuse et l'additionne goutte à goutte d'une liqueur titrée de chlorure de baryum. Entre deux affusions de ce réactif, la solution est clarifiée par un temps de centrifugation. On cesse d'ajouter le chlorure de baryum quand son addition ne produit plus aucun trouble et, connaissant la quantité de chlorure ajoutée, on en déduit facilement la quantité de soufre précipité.

Le chlorure de baryum ajouté ainsi à une solution de sulfate ne produit pas un trouble instantané. La méthode manque donc d'exactitude et, après essai, nous n'avons pas cru pouvoir l'utiliser.

DUPARC et BASADONNA (30) indiquent un moyen de dosage indirect. Un excès de chlorure de baryum est ajouté lors de la précipitation des sulfates, cet excès étant ensuite apprécié par addition de chromate de potassium. Il se produit une précipitation secondaire de chromate de baryum et l'opération est arrêtée quand la liqueur est teintée en jaune par un excès de chromate de potassium. C'est là un procédé industriel dont la précision s'est montrée insuffisante dans notre cas.

D'autres méthodes volumétriques ont été proposées. Ne les ayant pas essayées, nous renvoyons au mémoire de CHATRON (16) qui les a exposées en détail.

Pour de faibles quantités de soufre, il peut être avantageux d'évaluer par néphélémétrie le sulfate de

baryum formé. Suivant ce procédé, proposé par DENIS et Mlle REED (26-27), la précipitation s'effectue en milieu gélatiné. En utilisant un photomètre très précis, CHATRON a obtenu des résultats dont l'erreur relative ne dépasse par 5 p. 100 pour des teneurs en soufre de l'ordre de 5/100 de mg. par centimètre cube du liquide à doser.

MÉTHODE EMPLOYÉE POUR NOS RECHERCHES

Nous avons utilisé le procédé classique de précipitation des sulfates sous forme de sulfate de baryum, suivie de la pesée du sel.

Dans un bécher de 150 c.c. nous plaçons la liqueur légèrement chlorhydrique du milieu minéral à analyser. Cette solution, dont le volume est d'environ 50 c.c., est additionnée de 10 c.c. d'acétate d'ammonium à 5 p. 100, puis d'ammoniaque jusqu'à formation d'un précipité. On ajoute un excès d'ammoniaque et le bécher est mis quelques heures au bain-marie à 60°. Puis on filtre et le filtre est lavé soigneusement par de l'eau légèrement ammoniacale. Le fer reste sur le filtre sous forme de phosphate ferrique, une partie du zinc et du magnésium de la solution restent également sous forme de phosphates. Le filtrat est concentré au bain-marie bouillant, de sorte que l'ammoniaque s'élimine en très grande partie, les sulfates restant en solution.

La liqueur est alors transvasée dans un bécher de 250 c.c. et acidifiée légèrement par l'acide chlorhydrique. La solution, dont le volume est amené vers 150 c.c. est portée à l'ébullition qu'on laisse se poursuivre pendant quelques minutes, puis on ajoute lentement et goutte à

goutte 3 c.c. de chlorure de baryum à 10 p. 100. Cette quantité est très suffisante puisque, opérant sur la moitié du liquide de minéralisation d'une culture, nous avons au maximum 5 mg. de soufre correspondant à 40 mg. de chlorure de baryum.

Le gaz est réglé à très petite flamme pour entretenir une température voisine de la température d'ébullition. Le précipité de sulfate de baryum se forme et s'accumule peu à peu au fond du verre. Après une demi-heure, le liquide est clair et peut être décanté sur un petit filtre sans pli, en prenant la précaution de ne jamais amener le niveau du liquide à moins de 15 mm. des bords du filtre. Le sulfate de baryum remonte en effet le long du filtre avec la plus grande facilité et passe alors dans le filtrat. En prenant cette précaution, on obtient d'emblée un filtrat limpide. Nous utilisons le filtre Durieux n° 111, étiquette bleue. La décantation terminée, on introduit dans le bécher deux ou trois gouttes d'acide chlorhydrique; si celui-ci se colore, par suite de traces de fer ayant échappé à la précipitation ammoniacale, nous ajoutons quelques c.c. d'acide chlorhydrique et nous faisons bouillir le tout un instant. Nous étendons largement d'eau, neutralisons l'acide et réacidifions légèrement. Puis nous laissons déposer à nouveau le précipité. Nous décantons sur le filtre, comme précédemment, nous lavons le précipité à l'eau bouillante, opération suivie d'une nouvelle décantation. Nous entraînons enfin sur le filtre le contenu du verre.

Le précipité et le filtre sont lavés très soigneusement à l'eau bouillante, jusqu'au moment où l'eau du lavage ne trouble plus, même après quelques minutes de

TABLEAU I

Age des cult.	Soufre			Soufre contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total d'une culture		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	1,588	7,416	9,004	9,300	—3,180
	1,415	7,444	8,859	»	—4,740
32	3,248	5,908	9,156	»	—1,545
	3,049	6,208	9,257	»	—0,462
	2,966	6,565	9,531	»	+2,480
48	6,922	2,280	9,202	»	—1,054
	6,812	2,444	9,256	»	—0,473
	6,361	2,853	9,214	»	—0,926
72	7,397	1,768	9,165	»	—1,450
	7,169	2,115	9,284	»	—0,172
	6,840	2,500	9,340	»	+0,430
96	6,406	2,819	9,225	»	—0,813
	5,988	3,324	9,312	»	+0,130
	5,796	3,449	9,245	»	—0,591
120	5,109	4,257	9,366	»	+0,709
	5,371	4,016	9,387	»	+0,938
	5,284	3,845	9,129	»	—0,763

TABLEAU II

Age des cult.	Soufre			Soufre contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	1,030	7,993	9,023	9,300	—2,979
	0,989	8,103	9,092	»	—2,237
32	2,636	6,745	9,381	»	+0,873
	2,719	6,345	9,064	»	—2,538
	2,390	6,894	9,284	»	—0,172
48	4,587	4,642	9,229	»	—0,763
	4,619	4,564	9,183	»	—1,258
	4,642	4,504	9,146	»	—1,656
72	4,540	4,548	9,088	»	—2,285
	4,779	4,422	9,201	»	—1,065
	4,340	4,642	8,982	»	—3,420
96	3,915	5,215	9,130	»	—1,832
	3,516	5,851	9,367	»	+0,720
	3,653	5,439	9,092	»	—2,237
120	3,269	6,098	9,367	»	+0,720
	2,884	6,290	9,174	»	—1,355
	3,220	5,929	9,149	»	—1,623

contact, une solution de nitrate d'argent à 2 p. 1000. Enfin le filtre est séché à l'étuve à 90°; il reste très blanc, si les lavages ont été suffisants. Le filtre est enroulé dans un fil de platine et brûlé. Les cendres sont reçues dans un creuset de platine taré que l'on passe quelques instants dans la flamme d'un bec Meker pour détruire les traces de substances tombées du fil de platine avant carbonisation complète. Le produit obtenu est en général bien blanc, parfois un peu grisâtre. Il ne reste qu'à peser et à multiplier le résultat par le coefficient 0,135 pour obtenir le poids de soufre.

Les tableaux I et II montrent que le procédé d'analyse est précis, à condition toutefois de l'employer sans hâte et avec beaucoup de soin.

CHAPITRE IV

TECHNIQUES DE DOSAGE DU PHOSPHORE

Le phosphore se dose généralement sous forme de complexe molybdique ou sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien.

Dans les méthodes fondées sur l'existence d'un complexe phosphomolybdique, c'est sous forme de phosphomolybdate d'ammonium que le phosphore est précipité. Ce composé, dont le poids moléculaire est très élevé, renferme une faible proportion de phosphore. Il en résulte la possibilité d'obtenir des résultats très précis. La méthode de précipitation est décrite dans les manuels de chimie analytique, tels que ceux de DENIGÈS (25) et de TREADWELL-BOLL (91). Etant donné d'autre part que le phosphomolybdate d'ammonium renferme du molybdène et de l'ammoniaque, on a mis au point de nombreuses méthodes permettant de doser le phosphore en appréciant volumétriquement ou colorimétriquement les deux éléments qui lui sont associés. Un exposé de ces techniques a été fait par JAVILLIER et DJELATIDES (49).

La méthode de dosage du phosphore par précipitation du phosphomolybdate d'ammonium présente cependant de sérieux inconvénients. Suivant les conditions de précipitation, la composition du complexe varie.

Celui-ci, cependant, comme l'a montré POSTERNAK (81), est identique à lui-même si l'on se place dans des circonstances exactement semblables.

De plus, la méthode au phosphomolybdate est en défaut quand le milieu renferme une notable proportion de chlorures. Comme nous analysons sur une même culture le phosphore et le soufre et que le dosage de ce dernier nous amène à transformer en chlorures les nitrates qui existent dans le produit de la destruction, nous avons dû renoncer à doser le phosphore sous forme de phosphomolybdate.

COPAUX (17), en présence d'un acide minéral, amène le phosphore à l'état d'acide phosphomolybdique uni à l'éther et à l'eau. Cette méthode, exacte et rapide, est celle que nous avons utilisée quand, sans nous occuper du soufre, nous avons dosé le phosphore dans le produit d'une destruction sulfo-nitrique.

Les alcaloïdes, la strychnine en particulier, fournissent des composés où le phosphore et l'acide molybdique se présentent sous forme d'un complexe volumineux, facile à recueillir. DENIGÈS (24) a utilisé ce mode de précipitation pour en faire la base d'une méthode opacimétrique. EMBDEN (33), JAVILLIER et DE ST-RAT (50) pèsent le précipité dont la teneur en phosphore est voisine de 1,06 p. 100.

On dose fréquemment le phosphore en le précipitant sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien. La composition de ce phosphate, assez variable si l'on opère à froid, devient très régulière si la précipitation est opérée à chaud, ainsi que l'indique TREADWELL-BOLL (91). Le phosphate ammoniaco-magnésien est amené

par calcination à l'état de pyrophosphate de magnésium, qui renferme environ 28 p. 100 de son poids de phosphore. La méthode, on le voit, ne permet pas, à priori, une exactitude comparable à celle d'une pesée de phosphore sous forme de phosphomolybdate d'ammonium. De plus, le pyrophosphate de magnésium présente souvent de très notables surcharges. Nous avons fait des essais de dosage sur une solution complexe renfermant les éléments minéraux de notre liquide de culture. Nous y avons retrouvé le magnésium avec une erreur ne dépassant pas 0,5 p. 100. Opérant sur le milieu de culture, c'est-à-dire sur la solution minérale additionnée de saccharose puis traitée par l'acide nitrique pour la destruction de ce sucre, nous avons obtenu des résultats tout aussi précis. Nous avons alors ensemencé un volume de solution nutritive de 150 c.c. Après récolte et destruction du mycelium, la pesée du pyrophosphate nous a donné des erreurs variant de 10 à 40 p. 100. Le but que nous nous proposons d'atteindre étant le dosage du phosphore, il nous importait assez peu de connaître la nature de la surcharge, pourvu que tout le phosphore fût précipité. Nous avons eu recours, en conséquence, à un mode de dosage volumétrique par l'urane connu depuis très longtemps, vérifié lors de notre travail avec ECHEVIN (32) et dont les tableaux III et IV justifient l'exactitude.

Citons encore la méthode de LE GUYON (56) qui précipite le phosphore à l'état de phosphate triargentique où l'on dose volumétriquement l'argent; le procédé de FERDINAND JEAN, rappelé par DENIGÈS (25), où le phosphore est amené à l'état de phosphate d'urane et pesé

comme pyrophosphate, et la méthode de POSTERNAK (81) suivant laquelle le phosphore est pesé comme phosphomolybdate de baryum. Cette dernière méthode, un peu longue peut-être, peut servir de vérification à toutes les autres en raison de son exactitude.

TECHNIQUES UTILISÉES POUR NOS RECHERCHES

La liqueur chlorhydrique de destruction, après filtration pour éliminer la silice, est amenée, dans un bécher de 150 c.c., à un volume de 25 c.c. environ. On y ajoute 10 c.c. de liqueur citromagnésienne répondant à la formule suivante :

Acide nitrique	250 gr.
Carbonate de magnésium	25 gr.
Magnésie	12,5 gr.
Eau distillée	250 c.c.

Après dissolution, on ajoute :

Ammoniaque	400 c.c.
Eau distillée q. s. p.	1.000 c.c.

Le contenu du bécher est porté à l'ébullition, puis refroidi vers 60°. Après addition de quelques gouttes de phénolphtaléine, on verse goutte à goutte de l'ammoniaque au 1/5 jusqu'à virage accusé. On laisse alors le précipité se former, le bécher étant placé au bain-marie à 60° pendant une heure. Ensuite on ajoute au contenu du verre un cinquième de son volume d'ammoniaque. Le bécher, couvert, est placé dans un endroit frais pendant quelques heures. On est en possession d'une liqueur où le phosphore est précipité sous forme de phosphate

ammoniac-magnésien dont une partie adhère au verre, même si l'on a évité de se servir d'un agitateur.

La liqueur est filtrée et le phosphate reste sur le filtre. Si l'on désire peser sous forme de pyrophosphate de magnésium, on détache au moyen d'un agitateur à bout de caoutchouc les cristaux fixés au verre, on les entraîne sur le filtre, on lave très abondamment par l'ammoniaque à 10 p. 100. Le filtre est séché à l'étuve, le précipité en est détaché le plus possible et entraîné dans un creuset de platine. De son côté, le filtre est brûlé et les cendres sont jointes au sèl du creuset. Celui-ci est alors chauffé longuement dans la flamme d'un bec Meker ou d'une soufflerie, refroidi rapidement et pesé.

Au lieu de peser le précipité, on peut y doser volumétriquement le phosphore soit directement, soit indirectement en dosant l'ammoniaque du phosphate ammoniac-magnésien. BAUZIL (2) et MOUSSERON (72) ont ainsi ramené le dosage du phosphore à un dosage alcalimétrique.

Pour effectuer notre travail, nous avons utilisé l'insolubilisation du phosphore sous forme de phosphate d'uranyle, l'excès d'urane étant mis en évidence par la teinture de cochenille employée comme indicateur de virage. Le procédé est le suivant :

La liqueur où se trouve le phosphate ammoniac-magnésien est filtrée; le bécber et le filtre sont lavés à plusieurs reprises par de l'eau ammoniacale à 10 p. 100, mais sans prendre la peine de détacher les cristaux de phosphate qui adhèrent au verre. Les parois sont lavées par 5 c.c. d'acide nitrique pur versé goutte à goutte pour dissoudre le phosphate ammoniac-magnésien.

Le filtre encore humecté d'ammoniaque est enlevé de l'entonnoir, posé à plat dans une capsule de porcelaine de 10 cm. de diamètre où l'on verse la solution nitrique de phosphate, puis l'eau de rinçage du bécber. Le contenu de la capsule est porté à l'ébullition pour désagréger le filtre, puis refroidi. Le liquide est alors additionné de quelques gouttes de phénolphtaléine et neutralisé par de l'ammoniaque jusqu'à faible virage. On y verse 2 c.c. de teinture de cochenille. Celle-ci vire au violet et on ramène à la teinte pelure d'oignon par de l'acide azotique à 10 p. 100 versé goutte à goutte. Le mélange est ensuite additionné de 5 c.c. d'une solution acéto-acétique de formule :

Acétate de soude	100 gr.
Eau q. s. p.	500 c.c.

Après dissolution on ajoute 50 c.c. d'acide acétique et l'on complète le volume total à 1.000 c.c. par addition d'eau distillée.

Le contenu de la capsule est amené à 50 c.c. environ. On porte à une température voisine de l'ébullition et, en agitant constamment, on verse dans la solution à doser au moyen d'une burette graduée au 1/10 de c.c. une liqueur d'acétate d'urane telle que chaque c.c. de ce réactif correspond à 2 mgr. de $P^2 O^5$ et on arrête l'opération quand la cochenille a viré au vert.

Ce dosage ne présente aucune difficulté; avec un peu d'habitude on apprécie le virage d'une façon très nette, à condition de travailler en lumière naturelle. Nous avons complètement renoncé à utiliser comme indica-

TABLEAU III

Age des cult.	Phosphore			Phosphore contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	10,640	22,672	33,312	32,480	+2,562
	10,900	21,451	32,351	»	—0,397
32	18,480	13,945	32,425	»	—0,169
	18,137	14,475	32,612	»	+0,406
	16,742	15,173	31,915	»	—1,740
48	30,520	2,616	33,136	»	+2,019
	30,125	2,093	32,218	»	—0,806
	29,475	2,598	32,073	»	—1,253
72	19,671	12,559	32,230	»	—0,769
	19,358	12,731	32,089	»	—1,214
	18,138	13,777	31,915	»	—1,740
96	15,942	16,307	32,249	»	—0,711
	16,045	15,873	31,918	»	—1,740
	14,475	17,614	32,089	»	—1,214
120	9,592	22,497	32,089	»	—1,214
	9,724	23,203	32,927	»	+1,376
	10,336	22,846	33,182	»	+1,853

TABLEAU IV

Age des cult.	Phosphore			Phosphore contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total d'une culture		
h.	mg.	mg.	mg.	m.g	
24	10,830	21,650	32,480	32,480	0,
	10,650	22,350	33,000	»	+1,601
32	15,780	16,610	32,390	»	—0,585
	16,240	16,420	32,660	»	+0,554
	15,550	16,590	32,140	»	—0,739
48	20,440	12,400	32,840	»	+1,108
	21,060	11,950	33,010	»	+1,632
	20,610	12,220	32,830	»	+1,077
72	19,490	12,210	31,700	»	—2,402
	19,770	12,050	31,820	»	—1,724
	19,730	12,750	32,480	»	0,
96	14,390	17,570	31,960	»	—1,601
	15,020	16,940	31,960	»	—1,601
	15,370	17,290	32,660	»	+0,554
120	12,820	19,930	32,750	»	+0,831
	12,050	20,610	32,660	»	+0,554
	11,350	21,130	32,480	»	0,

teur externe le ferrocyanure de potassium qui complique le travail sans augmenter en rien la précision.

Cependant, étant donné le faible titre de la liqueur d'urane, il est indispensable d'opérer dans des conditions aussi identiques que possible. Si, pour obtenir le virage de la cochenille, il est nécessaire de verser plus de 15 c.c. de solution d'acétate d'urane, les résultats deviennent incertains et mieux vaut alors se servir de la solution d'acétate d'urane correspondant à 5 mg. de $P^2 O^5$ par c.c. de solution.

Chacune de nos cultures renferme une quantité de phosphore correspondant à 74,4 mg. de $P^2 O^5$ et nous effectuons le dosage sur une demi-culture, soit 37,2 mg. de $P^2 O^5$. Comme le phosphore est divisé entre le mycelium et le liquide nutritif, jamais nous ne sortons de la limite de 15 c.c. de solution d'acétate d'urane dont nous venons de parler et, dans ces conditions, les résultats que nous avons obtenus avec ECHEVIN (32), de même que les chiffres des tableaux III et IV montrent l'exactitude du procédé.

Sans doser le soufre sur le produit d'une même destruction, nous détruisons la substance organique par la méthode sulfonitrique et nous dosons le phosphore par la méthode de COPAUX (17).

La centrifugation s'effectue à une vitesse d'environ 1.000 tours pendant deux minutes. Le précipité est alors bien ramassé dans le tube gradué et la liqueur surnageante est claire. Un trouble serait l'indice d'une déficience en réactif molybdique.

Selon la teneur en phosphore des produits de des-

TABLEAU V

Age des cult.	Phosphore			Phosphore contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
jours	mg.	mg.	mg.	mg.	
1	10,64	22,67	33,31	32,48	+2,562
	10,90	21,45	32,35	»	—0,397
2	22,50	9,40	31,90	»	—1,785
	22,30	9,30	31,60	»	—2,790
3	28,25	4,40	32,65	»	+0,523
	27,00	4,75	31,75	»	—2,247
4	22,55	8,50	31,05	»	—4,403
	23,00	8,90	31,90	»	—1,785
6	12,85	18,50	31,35	»	—3,479
	12,15	19,50	31,65	»	—2,555
8	6,65	25,25	31,90	»	—1,785
	7,10	24,75	31,85	»	—1,940
12	5,45	26,30	31,75	»	—2,247
	6,10	25,25	31,35	»	—3,479
16	5,00	27,30	32,30	»	—0,554
	4,50	27,75	32,25	»	—0,708

truction, nous avons utilisé des ampoules dont la partie graduée représente un volume de 0,1 c.c.; 0,25 c.c.; 0,50 c.c.; 0,75 c.c. La graduation comporte 50 divisions.

Les résultats, résumés dans le tableau V, correspondant à l'une de nos séries de dosage, sont très satisfaisants.

CHAPITRE V

TECHNIQUE DE DOSAGE DU POTASSIUM

Les réactions du potassium sont nombreuses, elles ne sont malheureusement pas spécifiques. Sans nous occuper des métaux alcalins rares, l'ammonium précipite en même temps que le potassium, et c'est là un inconvénient très sérieux pour l'analyse de milieux synthétiques où il reste, après la récolte, une quantité souvent considérable d'ammonium. Il est facile d'éliminer cet élément par une calcination prudente. A l'usage, ce procédé se montre délicat et l'on enregistre des pertes sensibles de potassium. De sorte qu'en définitive, si l'on s'impose de retrouver la quantité de potassium mise à la disposition d'un végétal dans un milieu synthétique, l'opération présente de sérieux ennuis.

Parmi les réactifs du potassium, certains sont peu sensibles, utilisables seulement en présence d'une dose relativement forte de cet élément. Citons sans nous y arrêter le bitartrate de sodium qui donne un précipité de bitartrate de potassium soluble dans 60 parties d'eau, et l'acide picrique dont la réaction aboutit à un précipité cristallin jaune dont l'agitation facilite la formation.

Avec le réactif de CARNOT, hyposulfite double de

calcium et de bismuth, donnant un précipité d'un hyposulfite double de bismuth et de potassium, insoluble dans l'alcool, nous sommes en possession d'un réactif sensible et précis. Malheureusement, son emploi implique l'élimination préalable des autres composés insolubles dans l'alcool : sulfates, chlorures alcalins, de sorte que son champ d'utilisation est rapidement limité. Nous le mentionnons cependant parce qu'il permet de déceler de très petites quantités de potassium et aussi en raison de l'étude extrêmement soignée qu'en a faite GÉRARD (42). De plus, comme l'indique PERIETZEANU (80), cette réaction peut servir de point de départ à un dosage iodométrique du potassium sur lequel nous espérons pouvoir revenir dans la suite.

Nous arrivons enfin aux réactifs généralement utilisés pour le dosage du potassium : le bichlorure de platine donnant un précipité de chloroplatinate de potassium; l'acide perchlorique, insolubilisant le potassium sous forme de perchlorate; le nitrite double de cobalt et de sodium permettant de recueillir un nitrite complexe de cobalt, potassium et sodium.

La méthode au chloroplatinate est classique et l'on en trouvera un exposé détaillé dans la thèse de GÉRARD (42). Nous ne l'avons pas utilisée en raison de sa minutie et de sa lenteur et parce que, dans les conditions de notre travail, elle ne présente aucun avantage qui puisse la rendre préférable.

Le procédé consistant à insolubiliser le potassium comme nitrite complexe de cobalt, sodium et potassium, a fait l'objet de travaux récents. Leur examen détaillé

est fait par GRIFFON (45) et nous nous contenterons de rappeler ici quelques points indispensables au jalonnement de notre exposé.

FISCHER (36), en 1848, étudie le premier le nitrite cobaltico-potassique. En 1881, DE KÖNINCK (53) signale le moyen de déceler le potassium sous forme de nitrite complexe insoluble et il pense utiliser ce moyen pour séparer le sodium du potassium.

En 1898, ROSENHEIM et KOPELL (83), étudiant les acides cobaltinitreux, les divisent en trois groupes dont l'un, de formule générale $\text{Co}^2 (\text{NO}^2)^{12} \text{H}^6 + n\text{H}^2\text{O}$, donne des sels stables et, parmi ceux-ci, le nitrite cobaltico-potassique.

GILBERT (43), en 1898, traite de la précipitation quantitative du cobaltinitrite de potassium.

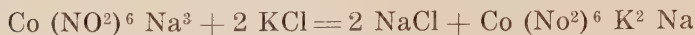
En 1900, BILLMANN (7) donne une technique de préparation du réactif cobalticosodique et recommande, en l'utilisant, d'éviter la présence d'acide phosphorique, d'acides minéraux libres et d'alcalis caustiques.

MITSCHERLICH, CELICHOWSKY et FISCHER (64) préfèrent le dosage du potassium sous forme de complexe cobaltico-potassique au dosage sous forme de chloroplatinate, alors que ZALESKI (97), discutant leur travail, montre que le nitrite cobaltico-potassique a une composition si variable qu'il est difficile de l'utiliser.

Examinant la question, GRIFFON (45) a noté quelques points sur lesquels les auteurs sont à peu près d'accord.

On admet généralement qu'en présence d'une faible

dose de potassium pour une forte quantité de réactif, la précipitation se fait selon la formule suivante :



La réaction est sensible et permet de précipiter le potassium à une dilution de 1/25.000 à 1/50.000.

Enfin s'il faut éviter la présence de l'ammoniaque, des bases et des acides minéraux forts, il ne semble pas que l'acide phosphorique, surtout en faible quantité, puisse gêner le dosage.

Par conséquent, on peut songer à doser le potassium par pesée directe du cobaltinitrite dont la masse, si l'on admet la formule précédente, représente 5,558 fois celle du potassium qui s'y trouve.

GILBERT (43) a utilisé ce procédé en 1898, il a été abandonné ensuite et c'est en 1917 seulement que GAROLA et BRAUN (40) l'ont repris pour des analyses agricoles.

Nous avons fait l'essai suivant : un milieu complexe a été préparé, renfermant par litre :

Solution de $\text{PO}^4 \text{ K H}^2$	à 19	p. 1000	50 c.c.
Solution de $\text{SO}^4 \text{ Mg}$	à 8	p. 1000	50 c.c.
Solution de $\text{SO}^4 \text{ Fe}$	à 0,46	p. 1000	50 c.c.
Solution de $\text{SO}^4 \text{ Zn}$	à 0,92	p. 1000	50 c.c.
Tartrate neutre d'ammonium			9,2 gr.
Saccharose			46,66 gr.

Nous avons évaporé à sec 100 c.c. de ce mélange et soumis le produit obtenu à l'action de l'acide nitrique fumant jusqu'à oxydation complète des composés organiques. Après élimination des sels ammoniacaux, nous avons divisé le résidu de la destruction en deux lots inégaux correspondant respectivement à 20 et 80 c.c.

du mélange préparé. En milieu acétique à 3 p. 100, chacun de ces lots a été traité par 0,5 gr. de nitrite cobaltico-sodique, centrifugé, lavé plusieurs fois, séché à l'étuve à 90° et pesé. Voici les résultats :

N° du lot	Nitrite théorique	Nitrite trouvé	Potassium théorique	Potassium trouvé	erreur %
	mg.	mg.	mg.	mg.	
1	30,44	29,90	5,449	5,353	— 1,74
2	121,75	123,2	21,795	22,055	+ 1,19

Sur le même milieu, nous avonsensemencé du *Sterigmatocystis nigra* et, après quelques jours, nous avons détruit, par l'acide nitrique, le mycelium et le liquide de culture. Les fioles coniques utilisées pour les cultures avaient reçu chacune 150 c.c. de liquide renfermant une quantité de potassium correspondant à un poids de cobaltinitrite de 228 mg. Nous avons obtenu 266 mgr. et des chiffres supérieurs dans d'autres essais, malgré des lavages répétés. Nous avons donc estimé inutile de poursuivre, dans les conditions de notre travail, des dosages basés sur la pesée du cobaltinitrite.

Un second moyen d'utiliser le cobaltinitrite est d'évaluer indirectement le potassium par le dosage volumétrique du cobalt, ou des groupements nitreux.

DELAVILLE et CARLIER (23), s'orientant vers le cobalt, le dosent par molybdomanganimétrie, selon une technique inspirée de la méthode de FONTÈS ET THIVOLLE (37). LEULIER, VELLUZ et GRIFFON (59) préfèrent le dosage des groupements nitreux et GRIFFON (45) étudie point

par point les détails qui permettent d'arriver à un dosage rigoureux du potassium. Le cobaltinitrite, précipité et centrifugé pour éviter l'emploi de filtres en amiante, est hydrolysé en présence de phosphate disodique. Les nitrites sont oxydés à froid par le permanganate de potassium en milieu sulfurique; enfin, l'excès de permanganate est dosé par iodométrie.

La méthode présentée par LEULIER, VELLUZ et GRIFFON est une micro-méthode. Si l'on en excepte l'inconvénient d'admettre pour le cobaltinitrite une formule encore controversée, elle donne des résultats excellents. Nous avons essayé sans succès de l'adapter à nos macrodosages; mais nous avons été gênés par la difficulté d'hydrolyser dans les conditions requises une quantité relativement forte de cobaltinitrite et peut-être aussi parce que, ne nous trouvant pas dans les conditions de dilution d'un microdosage, nous n'obtenions pas un cobaltinitrite de la formule prévue.

Le perchlorate de potassium est insoluble dans l'alcool; et cette propriété a été utilisée par SERULAS (86). Celui-ci employait comme agent de précipitation le perchlorate d'argent et après avoir recueilli le perchlorate de potassium calcinait celui-ci pour peser le potassium à l'état de chlorure.

La méthode fut reprise par SCHLOESING (84) qui prépare lui-même l'acide perchlorique et utilise d'ailleurs à peu près la technique de SERULAS. Cependant, comme le perchlorate de potassium entraîne en précipitant une assez notable proportion d'impuretés, SCHLOESING le redissout dans une petite quantité d'eau chaude, évapore à sec et précipite une seconde fois le perchlorate par

l'alcool à 96°. Après filtration et séchage à 250°, le perchlorate est pesé directement.

WENSE (96) conseille d'éliminer les sulfates par l'emploi du chlorure de baryum : ceux-ci sont, en effet, insolubles dans l'alcool.

CASPARI (15) filtre sur amiante, et préconise l'élimination des sels ammoniacaux, tandis que KREIDER (54) utilise, pour filtrer, un creuset de Gooch.

Au fond, à part des détails d'exécution, la méthode reste toujours semblable à elle-même et l'insolubilité presque complète du perchlorate de potassium dans l'alcool à 96° contenant 3 p. 1000 d'acide perchlorique permet d'en attendre des résultats intéressants.

Le procédé a été repris par PERIETZEANU (80) dans un travail fait sous la direction de Monsieur le Professeur BERTRAND, et celui-ci, récemment, l'a décrit (6) de la façon suivante que nous résumons : le composé organique est incinéré avec précaution, les cendres sont mises en solution légèrement chlorhydrique d'où l'on précipite les sulfates. La solution est amenée vers 20 c.c., et l'on y ajoute 2 c.c. d'acide perchlorique; puis l'on évapore à sec et l'on ajoute de nouveau un peu d'eau et 1 c.c. d'acide perchlorique. L'évaporation est alors menée au bain de sable jusqu'à production de fumées blanches d'acide perchlorique. Après refroidissement, on ajoute de l'alcool perchlorique et le perchlorate de potassium précipite. L'alcool surnageant est décanté sur creuset de Gooch taré et le précipité est redissous dans un peu d'eau chaude que l'on chasse ensuite par évaporation. On procède à une nouvelle précipitation par

l'alcool acide; le précipité est entraîné sur le creuset de Gooch, lavé à l'alcool perchlorique puis très peu à l'alcool simple. Le creuset est alors séché à 125° et pesé, le poids de potassium représentant 0,2822 de celui du perchlorate trouvé.

Nous avons essayé d'utiliser cette méthode sans la modifier. Mais quand il s'est agi de doser le potassium dans le liquide de culture, nous nous sommes heurtés à une impossibilité. Ce liquide renferme en effet une grande quantité de sels et, surtout pour des récoltes faites à des stades jeunes, ces sels se retrouvent presque complètement dans le milieu nutritif. En concentrant la liqueur après la destruction des composés organiques, nous aboutissions à un état de sursaturation tel que tout travail devenait impossible. Il restait la ressource de prendre une partie aliquote : mais nous nous heurtons alors à la solubilité du perchlorate dans l'alcool, rappelée par G. BERTRAND (6). Avec l'emploi d'un coefficient inévitable quand il s'agit de partie aliquote et la condition de retrouver en fin d'analyse la quantité de potassium mise à la disposition du *Sterigmatocystis*, nous étions enfermés dans un dilemme d'où nous ne pouvions nous échapper sans artifice.

Le cobaltinitrite de potassium étant insoluble en milieu acétique, nous avons pensé à isoler sous cette forme le potassium à doser, nous débarrassant ainsi de la presque totalité des sels qui nous gênaient. Nous avons vu d'ailleurs après coup dans GRIFFON (45) que WEBER et PIO MARTINI avaient eu jadis une idée analogue.

Nous avons également constaté, et DENNETT (28) l'a

vu comme nous, que, soumis à l'action de l'eau acétique, le précipité de cobaltinitrite tend à prendre un aspect colloïdal. De sorte que les lavages sont vite limités et qu'il résulte de ce fait une surcharge à peu près inévitable du précipité. Cette surcharge n'influe pas forcément sur les résultats des méthodes volumétriques; mais elle écarte la pesée du cobaltinitrite.

Bref, si le passage par la précipitation du potassium à l'état de cobaltinitrite nous semble un procédé d'épuration excellent, nous donnons la préférence pour le dosage final à la méthode au perchlorate qui permet la pesée du composé obtenu.

Il est bien entendu que nous envisageons les conditions de notre travail et non la micro-analyse où les procédés volumétriques gardent toute leur valeur, à condition d'en vérifier l'exactitude, non sur des sels minéraux dissous, mais sur un milieu organique ayant passé par tous les stades de la culture, puis de la destruction, avant d'aboutir au dosage. Nous avons procédé de la façon suivante :

Dans le ballon à extraction où se trouve le résidu de la destruction, celui-ci est repris par 250 c.c. d'eau bouillante. Après addition d'indicateur, nous neutralisons par la magnésie. Puis, en vue de chasser l'ammoniacque, nous ajoutons dans la liqueur 0,5 gr. de magnésie et nous portons à l'ébullition pendant 20 minutes. Nous avons essayé d'abord d'éliminer les sels ammoniacaux par une calcination modérée; même en usant de précaution, nous avons constaté souvent des pertes de potassium.

D'autre part, nous avons connu trop tard pour pouvoir l'utiliser le procédé de GRIFFON (45) qui, pour éliminer l'ammoniaque, emploie du nitrite de sodium en milieu acétique.

L'ammoniaque étant déplacée, la liqueur est filtrée et le filtre soigneusement lavé. Pour éviter l'adsorption de potasse par la magnésie, nous avons transformé celle-ci en chlorure de magnésium. Mais l'usage nous a montré que c'était une précaution superflue.

Le filtrat est ramené au bain-marie à un volume voisin de 30 c.c. et, après refroidissement, nous ajoutons 2 c.c. d'acide acétique et 1 gr. de cobaltinitrite de sodium.

Nous agitons fortement au moyen d'un agitateur qui reste dans le bécher et nous laissons reposer le précipité au moins 2 heures. Ceci fait, nous versons le contenu du bécher dans un tube centrifugeur ou le liquide peut être amené par portions de 15 c.c. environ. Par plusieurs centrifugations suivies de décantations, tout le précipité se trouve ramassé dans le tube centrifugeur. Pour décanter commodément, nous nous servons d'un petit aspirateur. Nous centrifugeons les tubes bouchés à une vitesse de 4.500 tours, mesurée au compte tours, et nous lavons deux fois le précipité avec de l'eau acétique. En tenant compte des sels du milieu de culture, du nitrate ajouté dans la destruction et du cobaltinitrite de sodium, les 30 c.c. de liquide à centrifuger contiennent environ 5 grammes de sels. Après rassemblement du précipité dans le tube centrifugeur et décantation, il reste au fond de ce tube 1,5 c.c., soit 1/20 des sels du début. Les deux lavages acétiques, chaque

fois par 15 c.c. de liquide, amènent donc la proportion finale à $\frac{1}{20} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{10}$, soit $\frac{1}{2.000}$ ou 2,5 mg. de sels, ce qui serait insignifiant si, de son côté, le nitrite précipité n'adsorbait rien.

Après deux lavages, l'eau acétique demeure louche, par suite de la mise en suspension d'une faible portion de cobaltinitrite. Il faudrait alors élever la vitesse de centrifugation. Mais on s'expose ainsi à briser les tubes et il en résulte de nombreux échecs.

Le tube contenant le précipité est placé au bain-marie bouillant, après avoir reçu 10 c.c. d'eau, un c.c. d'acide chlorhydrique, et 2 c.c. d'acide perchlorique.

L'hydrolyse est rapide et aboutit à un liquide coloré en bleu verdâtre par le cobalt. Le séjour au bain-marie est prolongé jusqu'à ce qu'il ne reste plus que quelques c.c. de liqueur dans le tube; puis celui-ci est placé dans une étuve à 135° jusqu'à production de vapeurs blanches abondantes.

Après refroidissement, nous sommes en présence d'une liqueur teintée en rose par le perchlorate de cobalt. Nous l'additionnons de 15 c.c. d'alcool perchlorique et nous centrifugeons après un intervalle d'un quart d'heure. Le perchlorate de potassium se rassemble rapidement. Nous décantons et lavons par 15 c.c. d'alcool. Ce lavage est suivi d'une décantation, d'une reprise du précipité par un peu d'eau bouillante que l'on élimine par évaporation. Enfin, après une recristallisation dans l'alcool perchlorique, un nouveau lavage par 15 c.c. de ce même alcool et un traitement par

TABEAU VI

Age des cult.	Potassium			Potassium contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	3,709	37,000	40,709	40,860	—0,369
	2,824	37,450	40,274	»	—1,434
32	18,840	20,810	39,650	»	—2,961
	19,373	20,439	39,812	»	—2,565
	20,471	19,711	40,182	»	—1,669
48	32,918	6,871	39,789	»	—2,621
	32,833	7,349	40,182	»	—1,659
	32,692	7,603	41,295	»	+1,065
72	32,355	8,025	40,380	»	—1,174
	32,805	7,518	40,323	»	—1,314
	31,510	8,279	39,789	»	—2,621
96	30,460	11,629	42,089	»	+3,008
	30,270	11,685	41,955	»	+2,680
	29,988	11,911	41,899	»	+2,543
120	29,427	10,982	40,409	»	—1,101
	28,816	11,123	39,939	»	—2,254
	29,089	10,892	39,981	»	—2,153

TABLEAU VII

Age des cult.	Potassium			Potassium contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	8,970	31,020	39,990	40,860	—1,980
	9,200	31,950	41,150	»	+0,850
32	12,350	27,580	39,930	»	—2,270
	13,250	27,380	40,630	»	—0,410
	10,520	30,850	41,370	»	+1,390
48	14,970	24,810	39,780	»	—2,500
	15,730	24,900	40,630	»	—0,410
	15,800	25,310	41,110	»	+0,610
72	17,200	23,830	41,030	»	+0,560
	16,500	23,830	40,330	»	—1,150
	18,330	22,420	40,750	»	—0,260
96	18,100	22,050	40,150	»	—1,590
	15,730	23,860	39,590	»	—2,960
	14,650	24,340	39,990	»	—2,130
120	19,460	20,440	39,900	»	—2,200
	18,530	21,430	39,960	»	—2,060
	19,620	20,930	40,550	»	—0,760

quelques c.c. d'alcool absolu pour éliminer l'acide perchlorique, nous portons le tube centrifugeur à l'étuve à 100° après l'avoir placé d'abord au bain-marie tiède pour évaporer la petite quantité d'alcool restant après la décantation finale, afin d'éviter les projections qui se produisent si l'on évapore brutalement le reste d'alcool.

Après apparition de vapeurs blanches, les tubes centrifugeurs sont refroidis et pesés.

La méthode est relativement longue, moins qu'elle ne le paraît cependant puisqu'on traite à la fois huit tubes centrifugeurs. C'est pour cette raison d'ailleurs que nous avons évité l'emploi du creuset de Gooch, car il est difficile d'avoir toute une série de fioles à vide pour la filtration par ce procédé.

L'exactitude obtenue est satisfaisante : les deux tableaux d'analyse VI et VII permettent de le constater. Même si une partie des sels ammoniacaux échappait à la destruction, la solubilité du perchlorate d'ammonium dans l'alcool perchlorique, de l'ordre de 0,5 p. 100 d'après nos mesures, est suffisante pour que les résultats restent acceptables.

L'erreur relative deviendrait évidemment beaucoup plus faible en opérant sur des solutions salines préparées à partir de produits purs et en évitant ainsi les manipulations inhérentes à la culture et à la destruction du *Sterigmatocystis nigra*.

CHAPITRE VI

TECHNIQUE DE DOSAGE DU MAGNÉSIUM

Le dosage du magnésium peut se faire soit à l'état d'oxyde ou de sulfate de magnésium, soit à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. C'est en général sous cette dernière forme que le magnésium est dosé.

Récemment, différents auteurs ont proposé des solutions nouvelles. HAHN (46) fait intervenir la tetraoxyanthraquinone qui, en solution alcaline, vire du rouge violet au bleu bleuet sous l'influence du magnésium. Par cette méthode, EULER, HELLSTRÖM et RUNEHJELM (34) dosent de petites quantités de magnésium avec une erreur relative de 6 p. 100.

HOUGH et FICKLEN (48), utilisant l'orthohydroxyquinoléine, proposent la méthode suivante :

La solution, contenant environ 1 mg. de magnésium pour un volume de 50 à 150 c.c., est rendue ammoniacale, chauffée vers 70° et traitée par un grand excès de 8-hydroxyquinoléine en solution à 0,5 p. 100 dans l'alcool. Il se forme rapidement un précipité qui, filtré et lavé par une solution faiblement ammoniacale, peut être calciné et pesé à l'état de MgO.

Volumétriquement, le même précipité peut être dosé après avoir été dissous dans l'acide sulfurique normal. La liqueur est additionnée de permanganate de potassium à 4,17 gr. par litre dont chaque c.c. correspond à

0,1 mg. de magnésium. La méthode donne des résultats concordants pour des quantités de magnésium de 1 mg. à 3 mg..

Nous l'avons même utilisée avec succès pour doser des quantités de l'ordre de 5 mg., en évitant l'apparition d'une teinte brune signalée par HOUGH et FICKLEN comme gênante pour l'observation du virage du permanganate. Malheureusement, nous avons connu cette méthode trop tard pour en faire une mise au point complète et nous reviendrons ultérieurement sur son emploi.

La méthode de précipitation du magnésium sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien est la méthode classique. Elle est utilisée pour le dosage du phosphore et il semblerait qu'une simple transposition des procédés conduise à un résultat satisfaisant. Il n'en est rien malheureusement, et le dosage du magnésium se révèle comme fort délicat.

Tout d'abord, le phosphate ammoniaco-magnésien est de composition assez variable suivant les conditions de la précipitation, et c'est justement sur le magnésium que portent les différences. CANALS (13) et TREADWELL-BOLL (91) donnent tous les renseignements à ce sujet. Disons simplement que la précipitation correcte du magnésium s'effectue à chaud, en milieu bien débarrassé de fer, riche en chlorure d'ammonium et où l'on verse de l'ammoniaque goutte à goutte et très lentement.

Ce n'est pas tout. Si l'on travaille sur une solution minérale complexe, le phosphate ammoniaco-magnésien adsorbe avec une très grande énergie différents sels du milieu, en particulier les phosphates. Et, lors de la pesée

du pyrophosphate de magnésium, il en résulte des surcharges qui peuvent être importantes. MOUSSERON (72) a étudié méthodiquement ces surcharges. Il a observé que par lavage à l'eau ammoniacale vers 60°, on obtient un phosphate ammoniaco-magnésien bien débarrassé des produits adsorbés. Nous conformant à toutes les recommandations faites par les auteurs précédents, nous avons pratiqué une série de dosages sur la partie minérale de la solution nutritive dont nous nous servons, une autre série sur la même solution additionnée de saccharose, une troisième série sur le milieu nutritif après y avoir fait végéter le *Sterigmatocystis nigra*. Les deux dernières séries avaient, naturellement, subi le traitement nécessaire à la destruction de la substance organique.

Exprimée en pyrophosphate de magnésium, la dose d'un flacon de culture correspond à 27,1 mg. ; nous avons obtenu pour les deux premières séries des nombres variant entre 26,7 et 27,5 mg.. Pour la troisième série, nous avons eu des surcharges variant de 10 à 30 p. 100 et parfois davantage. Nous avons essayé sans succès d'achever la destruction du mycelium par un mélange d'acide nitrique et d'acide perchlorique. Finalement, nous avons été contraint de dissoudre le précipité et de procéder à une seconde précipitation pour obtenir un résultat acceptable. Le phosphate ammoniaco-magnésien étant obtenu, il semble que le procédé le plus simple soit de le transformer en pyrophosphate de magnésium que l'on pèse. Mais, même en séparant autant qu'il se peut le précipité du filtre, celui-ci brûle mal. Si, comme l'indiquent certains auteurs, on humecte

le précipité à calciner d'une goutte d'acide nitrique pour favoriser l'élimination des particules de charbon, il se produit des pertes très sensibles. Nous avons donc songé à doser indirectement le magnésium.

On peut le faire soit en dosant le phosphore, soit en dosant l'ammoniaque du phosphate ammoniaco-magnésien.

Le premier moyen, pour lequel nous avons utilisé pour doser le phosphore la méthode de COPAUX, nous a donné des erreurs par excès tout à fait inacceptables. Les lavages prolongés par l'eau ammoniacale chauffée à 60° suivie d'une seconde cristallisation n'ont pu éliminer complètement la surcharge qui est restée de l'ordre de 10 p. 100.

Nous avons alors employé une méthode inspirée de la microméthode de MOUSSERON (72).

Le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien est filtré et lavé longuement à l'eau ammoniacale à une température de 60°-65°. Pour éliminer l'ammoniaque, le filtre est ensuite lavé à l'alcool à 95°, chauffé également vers 65°. Le lavage à l'alcool doit être suffisant pour éliminer l'ammoniaque.

Le filtre et son contenu sont alors introduits dans le ballon d'un appareil de SCHLOESING avec 300 c.c. d'eau distillée et 2 gr. de magnésie.

L'ammoniaque est recueilli dans 20 c.c. d'une solution
N
— d'acide sulfurique et, après distillation, l'acide sul-
50

furique en excès est dosé par de la soude $\frac{N}{50}$.

Tableau VIII

Age des cult.	Magnésium			Magnésium contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	0,44	5,16	5,60	5,90	—5,08
	0,38	5,37	5,75	»	—2,54
32	1,69	4,32	6,01	»	+1,86
	1,65	4,29	5,94	»	+0,68
	1,58	4,25	5,83	»	—1,18
48	3,89	1,83	5,72	»	—3,05
	4,00	1,87	5,87	»	—0,51
	3,80	1,88	5,68	»	—3,73
72	5,38	0,65	6,03	»	+2,20
	5,22	0,42	5,64	»	—4,40
	5,42	0,42	5,84	»	—1,00
96	4,82	1,00	5,82	»	—1,35
	4,79	1,07	5,86	»	—0,68
	4,87	1,03	5,90	»	0
120	4,02	1,82	5,84	»	—1,00
	3,60	2,19	5,79	»	—1,86
	4,12	1,98	6,10	»	+3,39

TABLEAU IX

Age des cult.	Magnésium			Magnésium contenu théoriquement dans 150 c. c. de solution nutritive	Erreur p. 100
	contenu dans le mycelium	retrouvé dans le liquide de culture	total		
h.	mg.	mg.	mg.	mg.	
24	0,47	5,25	5,72	5,90	—3,05
	0,52	5,20	5,72	»	—3,05
32	0,73	5,04	5,77	»	—2,20
	0,79	5,41	6,20	»	+5,10
	0,74	5,14	5,88	»	—0,34
48	0,63	5,33	5,96	»	+1,00
	0,21	5,52	5,73	»	—2,88
	0,32	4,25	5,57	»	—5,59
72	0,57	5,09	5,66	»	—4,05
	0,52	5,15	5,67	»	—3,89
	0,94	5,09	6,03	»	+2,20
96	0,68	5,35	6,03	»	+2,20
	0,47	5,20	5,67	»	—3,89
	0,05	5,83	5,88	»	—0,34
120	0,26	5,56	5,82	»	—1,35
	0,21	5,41	5,62	»	—4,72
	0,57	5,67	6,24	»	+5,76

Afin d'obtenir la précision nécessaire, nous avons été amené à employer comme indicateur de virage le rouge de phénol dont le spectre en milieu alcalin, est caractérisé par une bande d'absorption situés vers la zone vert-jaune du spectre. Ce procédé, proposé par BRUÈRE (11) nous a permis des dosages extrêmement précis. Nous utilisons, pour obtenir une épaisseur uniforme de liquide à examiner au spectroscope, des flacons de Roux de 150 c.c. Nous précipitons le magnésium en solution très étendue. Nous lavons le précipité du phosphate ammoniaco-magnésien par l'alcool chaud immédiatement avant d'introduire le filtre dans l'appareil de SCHLOESING.

Les tableaux VIII et IX permettent de se rendre compte des résultats obtenus, très satisfaisants si l'on observe que nous devons doser moins de 6 mg. de magnésium répartis dans un mycelium et un liquide subissant chacun un traitement en vue de la destruction de la substance organique, puis une série de manipulations ayant d'aboutir au dosage final.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE VII

VARIATION DU SOUFRE EN FONCTION DE L'ACIDITÉ DU MILIEU

Le rôle du soufre dans l'alimentation des plantes supérieures a fait l'objet de nombreux travaux. Selon un mémoire récent de LÉVIS (60), le soufre, indispensable aux végétaux, est, sous la forme minérale, uniquement utilisé à l'état de sulfate.

Chez les champignons, RAULIN (82), le premier, a mis en évidence le rôle primordial du soufre. Si l'on supprime cet élément, dans le milieu de culture, le champignon parvient souvent à se développer grâce au soufre existant à l'état d'impuretés dans les autres sels du milieu, mais, dans ce cas, le poids du mycelium ne dépasse pas $1/24^e$ du poids obtenu sur milieu non privé de soufre. COUPIN (19), pour se rendre compte de la forme sous laquelle le *Sterigmatocystis nigra* absorbe le soufre, fournit celui-ci au champignon à l'état de sels variés. Certains de ces sels : sulfure, sulfite et bisulfite de potassium se comportent comme des poisons; d'autres sont indifférents; l'aliment de choix est le sulfate d'ammonium.

SILBERSTEIN (87), après avoir vérifié que le soufre est indispensable à l'accroissement du champignon l'offre au *Sterigmatocystis nigra* sous forme de sulfate de potassium, de sulfate de magnésium et de sulfate

d'ammonium. Il fait varier les proportions du soufre dans le milieu nutritif. Le poids de substance sèche semble indépendant de la nature de la base, l'effet de chaque sulfate étant sensiblement le même. Le rendement optimum est obtenu pour une dose de soufre de 10 mg. pour 200 c.c. de liquide. Le mycelium fixe, en ce cas, les 3/4 du soufre mis à sa disposition dans le milieu de culture. Cette proportion diminue rapidement quand la dose de soufre augmente, bien que le poids maximum de substance sèche corresponde à une dose de soufre dix fois supérieure.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons voulu suivre l'évolution du soufre dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* par une série de cultures sur milieu au tartrate d'ammonium contenant 9,3 mg. de soufre pour 150 c.c. de solution nutritive. (Tableau X, fig. 1). Après 24 heures de végétation, nous trouvons dans le mycelium 1/6^e du soufre distribué. A 32 heures, cette quantité absolue a doublé, mais le poids de substance sèche a quadruplé, et le soufre s'y trouve dans la proportion de 2 p. 1000. Le mycelium, entre 32 et 48 heures, double de poids et la proportion de soufre dans la substance sèche reste la même; elle augmente ensuite légèrement au cours de l'autolyse pour atteindre 3 p. 1000 vers 120 heures. Au moment où la substance sèche atteint son poids maximum, elle renferme environ 7 mg. de soufre, ce qui correspond à peu près aux résultats de SILBERSTEIN.

Sur milieu au chlorure d'ammonium, les choses se

TABLEAU X

Variation du SOUFRE dans le mycelium de Sterigmatocystis nigra cultivé sur milieu au TARTRATE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Soufre		$\frac{S\ m}{S\ c}$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de sub- stance sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	3,7	0,380	1,588	4,17	0,17
	Culture n° 2	»	0,364	1,415	3,88	0,15
	Moyennes	»	0,372	1,501	4,02	0,16
32	Culture n° 1	5,5	1,511	3,248	2,15	0,35
	Culture n° 2	»	1,450	3,049	2,10	0,33
	Culture n° 3	»	1,362	2,966	2,17	0,32
	Moyennes	»	1,441	3,088	2,14	0,33
48	Culture n° 1	1,5	3,791	6,922	1,82	0,74
	Culture n° 2	»	3,436	6,812	1,98	0,73
	Culture n° 3	»	3,149	6,361	2,02	0,68
	Moyennes	»	3,458	6,698	1,94	0,72
72	Culture n° 1	1,2	3,230	7,397	2,29	0,79
	Culture n° 2	»	3,115	7,169	2,30	0,77
	Culture n° 3	»	3,054	6,840	2,24	0,73
	Moyennes	»	3,133	7,135	2,28	0,76
96	Culture n° 1	0,9	2,445	6,406	2,62	0,70
	Culture n° 2	»	2,407	5,988	2,48	0,64
	Culture n° 3	»	2,236	5,796	2,59	0,62
	Moyennes	»	2,363	6,063	2,56	0,65
120	Culture n° 1	0,5	1,883	5,109	2,71	0,55
	Culture n° 2	»	1,821	5,371	2,95	0,58
	Culture n° 3	»	1,779	5,384	3,02	0,58
	Moyennes	»	1,828	5,288	2,89	0,57

* $\frac{S\ m}{S\ c}$ Le rapport — est le rapport du soufre contenu dans le mycelium au soufre distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

passent différemment (Tableau XI, fig. 2). La réaction du milieu s'est montrée plus favorable au départ de la végétation, de sorte que, à 24 heures, la quantité de soufre absorbée est égale au $1/8^e$ de la quantité de soufre distribuée au début de l'expérience, mais elle

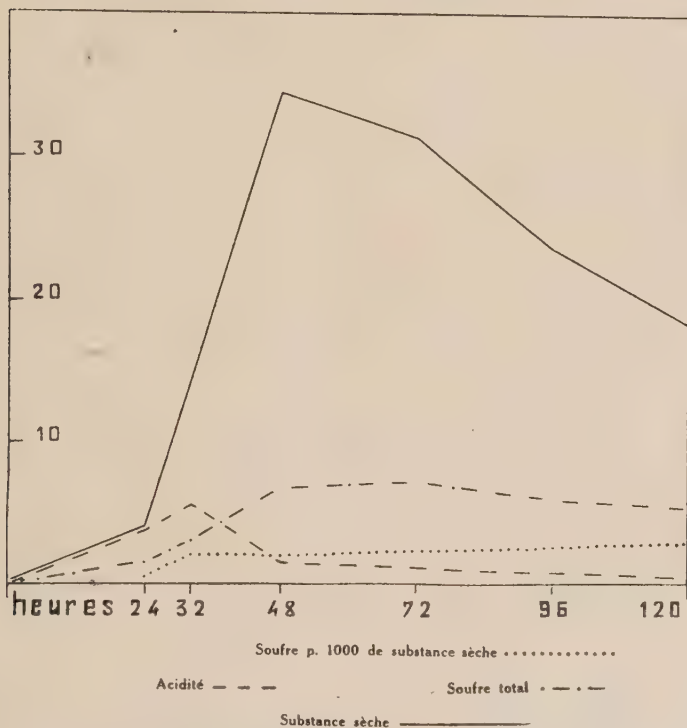


Fig. 1. — Variation du SOUFRE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium (substance sèche en dg., soufre en mg., acidité en c.c. de soude normale).

ne représente que 1,3 p. 1000 du poids de la substance sèche.

L'acidité du milieu se développe à mesure que le chlorure d'ammonium est utilisé, et l'effet de cette aci-

TABLEAU XI
Variation du SOUFRE dans le mycelium de *Sterigmatocystis*
nigra cultivé sur milieu au CHLORURE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Soufre		$\frac{S m}{S c}$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	4,5	0,720	1,030	1,43	0,11
	Culture n° 2	»	0,785	0,989	1,26	0,13
	Moyennes	»	0,752	1,009	1,34	0,12
32	Culture n° 1	8,5	1,560	2,636	1,69	0,28
	Culture n° 2	»	1,553	2,719	1,75	0,30
	Culture n° 3	»	1,485	2,390	1,61	0,26
	Moyennes	»	1,533	2,582	1,68	0,28
48	Culture n° 1	12,5	2,611	4,587	1,76	0,49
	Culture n° 2	»	2,524	4,619	1,83	0,49
	Culture n° 3	»	2,492	4,642	1,86	0,50
	Moyennes	»	2,542	4,616	1,82	0,49
72	Culture n° 1	14,0	3,263	4,540	1,39	0,49
	Culture n° 2	»	3,243	4,779	1,47	0,51
	Culture n° 3	»	3,218	4,340	1,35	0,47
	Moyennes	»	3,241	4,553	1,40	0,49
96	Culture n° 1	13,2	3,318	3,915	1,18	0,42
	Culture n° 2	»	3,289	3,516	1,07	0,38
	Culture n° 3	»	3,234	3,653	1,13	0,39
	Moyennes	»	3,280	3,694	1,12	0,36
120	Culture n° 1	11,5	3,189	3,269	1,02	0,35
	Culture n° 2	»	3,156	2,884	0,91	0,31
	Culture n° 3	»	3,139	3,220	1,01	0,34
	Moyennes	»	3,161	3,124	0,98	0,33

* Le rapport $\frac{S m}{S c}$ est le rapport du soufre contenu dans le mycelium au soufre distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

dité se fait progressivement sentir sur la pénétration du soufre, ainsi que l'a montré MOLLIARD (67). A 48 heures, le soufre et la substance sèche sont entre eux dans la proportion de 1,8 p. 1000; puis, tandis que le poids

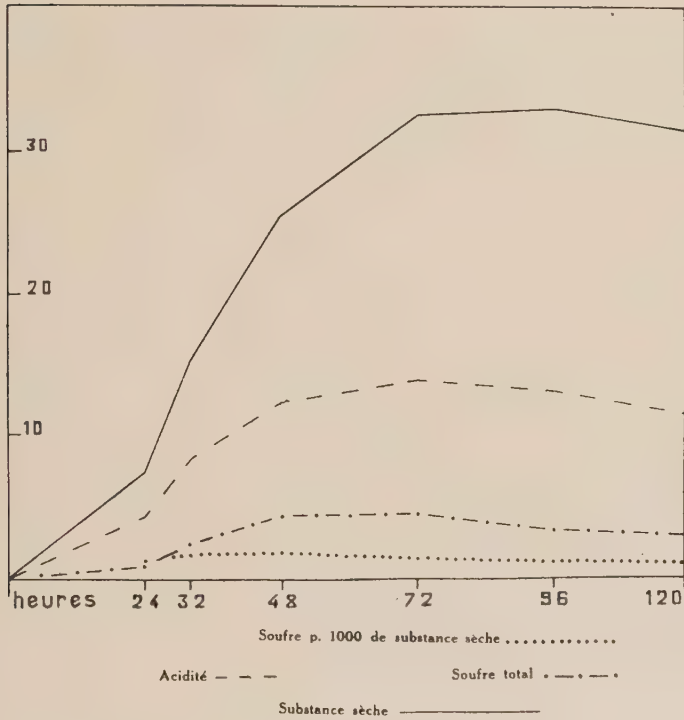


Fig. 2. — Variation du SOUFRE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé en milieu au chlorure d'ammonium (substance sèche en dg., soufre en mg., acidité en c.c. de soude normale).

de substance sèche continue à croître avant de se stabiliser aux environs de 3 grammes, la proportion de soufre baisse nettement pour n'être plus que de 1 p. 1000 à 120 heures. Entre 48 et 120 heures, le poids du myce-

lium augmente de $1/5^e$; la proportion de soufre baisse de $1/2$.

D'autre part la quantité de soufre contenue dans le mycelium n'a jamais dépassé la moitié de la quantité de soufre offerte, alors que, dans le cas du milieu au tartrate d'ammonium, elle s'élève aux trois quarts de la quantité de soufre offerte dans le milieu de culture. Il semble qu'il existe une difficulté de pénétration du soufre dans le mycelium en milieu acide. Observons, d'autre part, que les quantités absolues de soufre éliminées par le mycelium sont de même ordre sur milieu au tartrate et sur milieu au chlorure d'ammonium. L'acidité interviendrait donc moins pour accélérer la perte en soufre que pour retarder l'autolyse des autres éléments du mycelium. Notons encore que les courbes représentant l'absorption du soufre sur les deux milieux de culture sont semblables, la courbe sur milieu au chlorure d'ammonium est simplement décalée vers le bas. Il est permis de penser que, dans la formation des produits sulfurés, l'ordre de grandeur du phénomène est modifié, mais que sa nature reste la même sous l'action de l'acidité.

CHAPITRE VIII

VARIATION DU PHOSPHORE EN FONCTION DE L'ACIDITÉ DU MILIEU

L'étude du phosphore a été faite principalement chez les plantes supérieures et en vue des besoins de l'agriculture. Pour les champignons, RAULIN (82), le premier, a étudié méthodiquement le rôle des phosphates. Une culture privée de phosphore donne seulement $\frac{1}{182}$ de récolte normale.

COUPIN (18) introduit dans le milieu de culture du phosphore sous différentes formes, cet élément étant mis à la disposition du *Sterigmatocystis nigra* à l'état soit de phosphates, soit de composés organiques. L'expérience montre que le champignon utilise indifféremment les divers aliments phosphorés qui lui sont présentés.

MOLLIARD (68), ramenant la quantité de phosphore au $1/25^e$ de la dose normale constate une production beaucoup plus intense d'acide oxalique et conclut que le phosphore est indispensable à l'oxydation des sucres. A cette dose, et si l'acidité du milieu le permet, le mycelium fructifie. MOLLIARD (71), observe également que la fructification se produit encore avec une dose de phosphore égale à $1/100^e$ de la dose normale, pourvu que la solution nutritive contienne, par rapport au phosphore, un grand excès de potassium.

En résumé, les auteurs se sont attachés surtout à voir le retentissement, sur le poids de la récolte et sur la

fructification de la masse du phosphore présentée au *Sterigmatocystis nigra*.

RECHERCHES PERSONNELLES

Comme pour le soufre, et sur la même série de cultures, nous avons suivi l'évolution du phosphore pendant une durée de végétation allant de 24 à 120 heures.

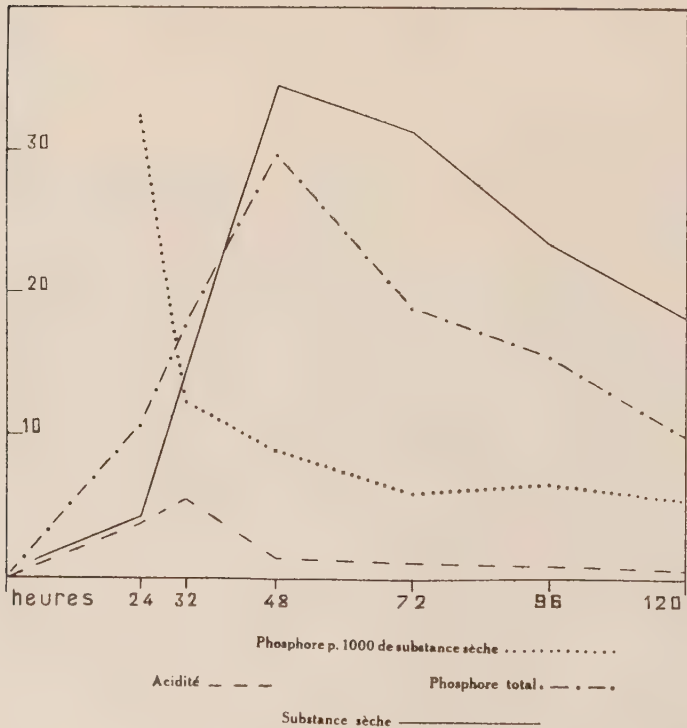


Fig. 3. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

TABLEAU XII

Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au TARTRATE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Phosphore		$\frac{P m}{P c}$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr	mg		
24	Culture n° 1	3,7	0,380	10,640	35,25	0,33
	Culture n° 2	»	0,364	10,900	29,94	0,33
	Moyennes	»	0,372	10,770	32,59	0,33
32	Culture n° 1	5,5	1,511	18,480	12,23	0,57
	Culture n° 2	»	1,450	18,137	12,31	0,56
	Culture n° 3	»	1,362	16,742	12,29	0,51
	Moyennes	»	1,441	17,786	12,28	0,55
48	Culture n° 1	1,5	3,791	30,520	8,05	0,94
	Culture n° 2	»	3,436	29,125	9,97	0,90
	Culture n° 3	»	3,149	29,475	9,36	0,90
	Moyennes	»	3,458	29,707	9,12	0,91
72	Culture n° 1	1,2	3,230	19,671	6,09	0,60
	Culture n° 2	»	3,115	19,358	6,21	0,59
	Culture n° 3	»	3,054	18,138	5,94	0,56
	Moyennes	»	3,133	19,056	6,08	0,58
96	Culture n° 1	0,9	2,445	15,942	6,52	0,49
	Culture n° 2	»	2,407	16,045	6,66	0,49
	Culture n° 3	»	2,236	14,475	6,47	0,44
	Moyennes	»	2,363	15,487	6,55	0,47
120	Culture n° 1	0,5	1,883	9,592	5,10	0,29
	Culture n° 2	»	1,821	9,724	5,34	0,30
	Culture n° 3	»	1,779	10,336	5,80	0,32
	Moyennes	»	1,828	9,884	5,41	0,30

Le rapport $\frac{P m}{P c}$ est le rapport du phosphore contenu dans le mycelium au phosphore distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

Pour 150 c.c. de liquide, la solution nutritive renferme 32,48 mg. de phosphore administré sous forme de phosphate monopotassique. Sur milieu au tartrate d'ammonium (Tableau XII, fig. 3), dès le début de la végétation, l'absorption de phosphore est extrêmement intense.

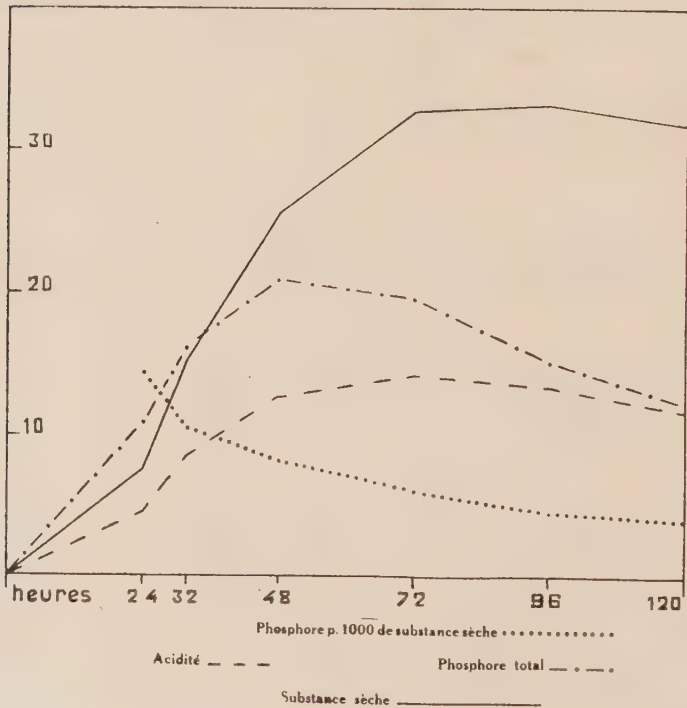


Fig. 4. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au chlorure d'ammonium (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

A 24 heures le mycelium renferme déjà le tiers du phosphore total et celui-ci représente 32 p. 1000 du poids de substance sèche. Le poids du mycelium augmente

TABLEAU XIII

Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de Sterigmatocystis nigra cultivé sur milieu au CHLORURE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Phosphore		$\frac{P m}{P c}$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	4,5	0,785	10,83	13,79	0,33
	Culture n° 2	»	0,720	10,65	14,79	0,33
	Moyennes	»	0,752	10,74	14,29	0,33
32	Culture n° 1	8,5	1,560	15,78	10,15	0,48
	Culture n° 2	»	1,553	16,24	10,46	0,50
	Culture n° 3	»	1,485	15,55	10,47	0,48
	Moyennes	»	1,533	15,86	10,36	0,48
48	Culture n° 1	12,5	2,611	20,44	7,82	0,63
	Culture n° 2	»	2,524	21,06	8,35	0,65
	Culture n° 3	»	2,492	20,61	8,27	0,63
	Moyennes	»	2,542	20,70	8,14	0,63
72	Culture n° 1	14,0	3,263	19,49	5,98	0,60
	Culture n° 2	»	3,243	19,77	6,09	0,61
	Culture n° 3	»	3,218	19,73	6,13	0,61
	Moyennes	»	3,241	19,66	6,07	0,61
96	Culture n° 1	13,2	3,318	14,39	4,48	0,44
	Culture n° 2	»	3,289	15,02	4,57	0,46
	Culture n° 3	»	3,234	15,37	4,75	0,47
	Moyennes	»	3,280	14,92	4,60	0,46
120	Culture n° 1	11,5	3,189	12,82	3,99	0,39
	Culture n° 2	»	3,156	12,05	3,82	0,34
	Culture n° 3	»	3,139	11,35	3,62	0,35
	Moyennes	»	3,161	12,07	3,81	0,36

* Le rapport $\frac{P m}{P c}$ est le rapport du phosphore contenu dans le mycelium au phosphore distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

ensuite plus rapidement que la proportion de phosphore. Au moment où le mycelium atteint son maximum de poids, presque tout le phosphore s'y trouve inclus. La sporulation débute à ce moment, et il en résulte une consommation considérable de substances phosphorées. En quelques heures le tiers du phosphore qui se trouvait dans le mycelium retourne dans le milieu de culture, bien que le poids de substance sèche diminue à peine du dixième. Puis le phénomène se régularise et de 72 à 120 heures l'élimination du phosphore se poursuit parallèlement à la perte de substance sèche.

Sur milieu au chlorure d'ammonium (Tableau XIII, fig. 4), à l'âge de 24 heures, le tiers du phosphore total de la solution nutritive est passé dans le mycelium; il n'en représente pourtant que 14 p. 1000 du poids de substance sèche.

A ce stade d'ailleurs, l'acidité légère du milieu intervient pour favoriser nettement la formation de substance sèche. Mais contrairement à ce qui est observé pour le soufre, le potassium et surtout le magnésium, l'acidité ne gêne pas l'assimilation du phosphore. Le mycelium cultivé sur milieu au chlorure d'ammonium, où la sporulation ne se produit pas, renferme autant de phosphore que le mycelium cultivé sur tartrate, où la sporulation se produit, si l'on excepte la quantité de phosphore qui pénètre dans le mycelium avant la sporulation et retourne dans le milieu de culture immédiatement après. Comme pour le soufre, l'autolyse minérale se poursuit, indépendamment de la diminution du poids total de la substance sèche. Entre 72 et 120 heu-

res, sur les deux milieux de culture, le mycelium élimine des masses à peu près égales de phosphore. Cette quantité semble donc correspondre à la fraction de phosphore nécessaire pour assurer la vie ralentie du *Sterigmato-cystis nigra*.

CHAPITRE IX

VARIATION DU POTASSIUM EN FONCTION DE L'ACIDITÉ DU MILIEU

RAULIN (82) introduit le potassium dans le milieu sur lequel il cultive le *Sterigmatocystis nigra*, après avoir constaté que cet élément est indispensable au développement du champignon; en son absence le poids de la récolte ne dépasse pas 1/20^e du poids d'une récolte normale.

BENECKE (3), cultivant le *Sterigmatocystis nigra* sur milieu minéral complexe note que, sans potassium, le végétal ne fructifie pas, même après une période de culture prolongée.

COUPIN et MOLLIARD (22) obtiennent, en privant les cultures de potassium, des modifications très importantes dans la morphologie du *Sterigmatocystis nigra*. MOLLIARD (69) montre que, pour une dose de potassium réduite au 1/80^e, la végétation est très ralentie. Il y a production d'un pigment jaune d'or et d'une grande quantité d'acide oxalique; la fructification ne se produit pas. Pour établir que la stérilité du champignon est bien due au défaut de potassium, MOLLIARD (70) en introduit aseptiquement dans une culture demeurée stérile : des conidies apparaissent immédiatement.

Plus récemment, reprenant l'étude des conditions de la sporulation du *Sterigmatocystis nigra*, MOLLIARD

(71) met en évidence que la formation des conidies est déterminée par une inanition en phosphore et en l'un quelconque des éléments nutritifs autres que le potassium, et en même temps par un excès de potassium vis-à-vis de l'élément qui fait défaut. PERIETZEANU (80), dans un travail sur les propriétés nutritives du sodium, rappelle que celui-ci ne peut remplacer le potassium et démontre ce fait expérimentalement.

Enfin, tout récemment, BRETIN, MANCEAU et REY (10), expérimentant sur le *Penicillium glaucum*, distribuent le potassium sous forme d'azotate ou de chlorure. Aux faibles concentrations, le potassium du chlorure est mieux absorbé que le potassium de nitrate. A partir de 0,5 p. 100, le poids de substance sèche diminue et la différence s'accroît avec la concentration en chlorure de la solution nutritive.

RECHERCHES, PERSONNELLES

Nous avons distribué le potassium dans les cultures à la dose de 40,85 mg. pour 150 c.c. de solution nutritive. Sur milieu au tartrate d'ammonium (Tableau XIV, fig. 5), le potassium est très faiblement absorbé au début de la végétation. Vers 32 heures la moitié du potassium du milieu se retrouve dans le mycelium dont la teneur en potassium est alors de 13 p. 1000 de la substance sèche. Cette proportion diminue à 9 p. 1000 entre 48 et 72 heures pour remonter ensuite jusqu'à 120 heures, terme de nos expériences.

Le mycelium atteint son poids maximum vers 48 heures et renferme alors 33 mg. de potassium. A 120 heures, le poids de substance sèche a diminué de 1 gr., soit

d'un tiers, et le mycelium contient encore 29 mg. de potassium, soit environ les 9/10^e de la quantité précédente. Il en résulte que les substances dans la composition desquelles entre le potassium sont engagées très faiblement dans les phénomènes d'autolyse.

Sur milieu au chlorure d'ammonium (Tableau XV, fig. 6), dès que l'acidité est notable, la pénétration du potassium dans le mycelium est affaiblie et retardée, par comparaison avec ce qui se passe sur milieu au

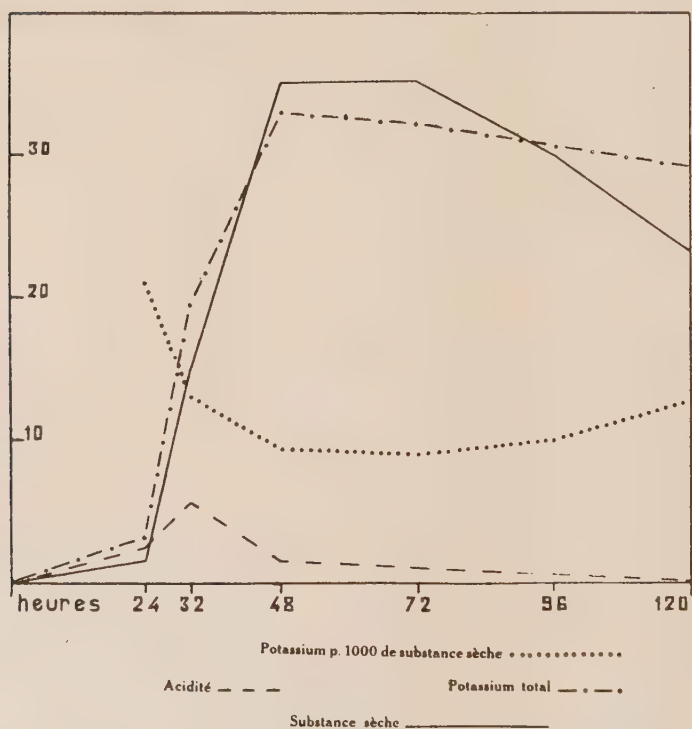


Fig. 5. — Variation du POTASSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium (substance sèche en dg., potassium en mg., acidité en c.c. de soude normale).

TABLEAU XIV

Variation du POTASSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au TARTRATE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Potassium		$\frac{K m}{K c}$
				contenu dans le mycel. mg.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.			*
24	Culture n° 1	2,5	0,168	3,709	22,02	0,09
	Culture n° 2	»	0,138	2,824	20,38	0,07
	Moyennes	»	0,153	3,266	21,20	0,08
32	Culture n° 1	5,6	1,516	18,840	12,43	0,46
	Culture n° 2	»	1,492	19,373	12,98	0,47
	Culture n° 3	»	1,443	20,471	14,19	0,51
	Moyennes	»	1,484	19,561	13,20	0,48
48	Culture n° 1	1,5	3,612	32,918	9,11	0,80
	Culture n° 2	»	3,504	32,833	9,37	0,80
	Culture n° 3	»	3,386	32,692	9,65	0,80
	Moyennes	»	3,501	32,814	9,38	0,80
72	Culture n° 1	0,1	3,554	32,355	9,10	0,79
	Culture n° 2	»	3,552	32,805	9,23	0,80
	Culture n° 3	»	3,430	31,510	9,18	0,77
	Moyennes	»	3,512	32,223	9,17	0,78
98	Culture n° 1	0,1	3,048	30,460	9,99	0,74
	Culture n° 2	»	2,997	30,270	10,10	0,74
	Culture n° 3	»	2,969	29,988	10,10	0,73
	Moyennes	»	3,004	30,239	10,06	0,74
120	Culture n° 1	0	2,390	29,427	12,31	0,72
	Culture n° 2	»	2,357	28,816	12,22	0,70
	Culture n° 3	»	2,134	29,089	13,63	0,71
	Moyennes	»	2,294	29,111	12,72	0,71

* Le rapport $\frac{K m}{K c}$ est le rapport du potassium contenu dans le mycelium au potassium distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

TABLEAU XV

Variation du POTASSIUM dans le mycelium de Sterigmatocystis nigra cultivé sur milieu au CHLORURE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Potassium		$\frac{K m}{K c}$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	4,5	0,785	9,20	11,72	0,22
	Culture n° 2	»	0,720	8,97	12,46	0,22
	Moyennes	»	0,752	9,08	12,09	0,22
32	Culture n° 1	8,5	1,560	12,35	7,92	0,30
	Culture n° 2	»	1,553	13,25	8,38	0,32
	Culture n° 3	»	1,485	10,52	7,08	0,26
	Moyennes	»	1,532	12,04	7,79	0,29
48	Culture n° 1	12,5	2,611	14,97	5,73	0,33
	Culture n° 2	»	2,524	15,73	6,23	0,38
	Culture n° 3	»	2,492	15,80	6,34	0,39
	Moyennes	»	2,542	15,50	6,10	0,37
72	Culture n° 1	14,0	3,263	17,20	5,27	0,42
	Culture n° 2	»	3,243	16,50	6,40	0,40
	Culture n° 3	»	3,218	18,33	5,86	0,45
	Moyennes	»	3,241	17,34	5,84	0,42
96	Culture n° 1	13,2	3,318	18,10	5,45	0,44
	Culture n° 2	»	3,289	15,73	4,78	0,38
	Culture n° 3	»	3,234	14,65	4,53	0,36
	Moyennes	»	3,280	16,16	4,92	0,39
120	Culture n° 1	11,5	3,189	19,46	6,10	0,47
	Culture n° 2	»	3,156	18,53	7,31	0,45
	Culture n° 3	»	3,139	19,62	6,25	0,48
	Moyennes	»	3,161	19,20	6,55	0,47

* $\frac{K m}{K c}$ Le rapport — est le rapport du potassium contenu dans le mycelium au potassium distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

tartrate d'ammonium. Mais en dehors de ces modifications de temps et d'ordre de grandeur, les faits restent les mêmes et le potassium, après sa pénétration dans le

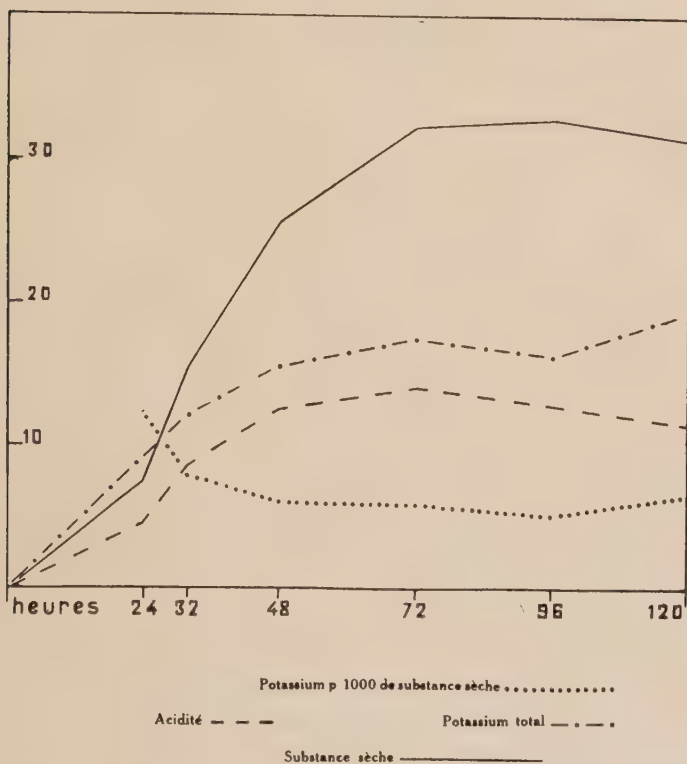


Fig. 6. — Variation du POTASSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au chlorure d'ammonium (substance sèche en dg., potassium en mg., acidité en c.c. de soude normale).

mycelium, ne retourne plus dans le milieu de culture. De plus, jusqu'à 120 heures, le mycelium continue d'absorber du potassium. L'autolyse ne semble donc pas porter sur les substances qui renferment du potassium.

CHAPITRE X

VARIATION DU MAGNÉSIUM EN FONCTION DE L'ACIDITÉ DU MILIEU

RAULIN (82) a établi la nécessité du magnésium pour le développement du *Sterigmatocystis nigra*. Sur milieu contenant, par litre, 0,32 gr. de carbonate de magnésium le poids de la récolte égale 91 fois le poids d'une récolte sur milieu privé de magnésium.

BENECKE (3) conclut dans le même sens, observant en outre que la quantité de magnésium doit augmenter en raison de l'acidité du milieu de culture.

COUPIN (21), modifiant le liquide de RAULIN, substitue au carbonate de magnésium une série d'autres sels magnésiens. Dans tous les cas, le magnésium est absorbé avec la plus grande facilité par le *Sterigmatocystis nigra*. Ce métal a été beaucoup étudié au point de vue de sa toxicité vis-à-vis des plantes supérieures, en particulier par COUPIN (20). CANALS (13) établit que le magnésium contenu dans le milieu de culture du *Sterigmatocystis nigra* est toxique à la concentration de 1 p. 1000 et présente à la dilution de 1 p. 2000 une action optimum sur la végétation. La dilution de 1 p. 100.000 paraît être la limite inférieure en-dessous de laquelle

le champignon n'arrive plus à se développer normalement.

TAMIYA (89), sur *Aspergillus Orizae*, constate que les métaux alcalino-terreux favorisent la croissance en milieu très acide et deviennent toxiques si l'acidité du milieu est faible. Ces résultats confirment les observations de BENECKE et de CANALS.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons cultivé le *Sterigmatocystis nigra* sur solution nutritive renfermant 5,9 mg. de magnésium pour 150 c.c. de liquide de culture, ce qui correspond à une dilution de $\frac{1}{25.000}$.

Le poids de substance sèche ne dépasse pas 3,5 gr., soit 1 gr. de moins que le poids optimum obtenu par CANALS. Il n'est cependant pas possible d'établir un terme de comparaison en raison des différences dans la nature, le volume et l'épaisseur des solutions nutritives et dans les formes des vases de culture; ces différences ont, selon RAULIN (82), une grande influence sur le rendement.

Sur milieu au tartrate d'ammonium (Tableau XVI, fig. 7), le magnésium est absorbé de façon progressive. A 24 heures, le mycelium contient à peine le 1/15^e de la quantité mise à sa disposition et il faut arriver à 72 heures, c'est-à-dire à un stade où la sporulation est déjà avancée, pour que l'on retrouve dans le champignon presque tout le magnésium distribué.

Au cours de l'autolyse, les substances contenant du

TABLEAU XVI

Variation du MAGNÉSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au TARTRATE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Magnésium		$Mg-m$ $Mg-c$
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	2,5	0,184	0,44	2,39	0,074
	Culture n° 2	»	0,164	0,38	2,32	0,064
	Moyennes	»	0,174	0,41	2,35	0,069
32	Culture n° 1	5,7	1,092	1,69	1,55	0,286
	Culture n° 2	»	1,078	1,65	1,53	0,280
	Culture n° 3	»	1,050	1,58	1,50	0,267
	Moyennes	»	1,073	1,64	1,52	0,278
48	Culture n° 1	2,5	3,485	3,89	1,12	0,659
	Culture n° 2	»	3,450	4,00	1,16	0,678
	Culture n° 3	»	3,299	3,80	1,15	0,644
	Moyennes	»	3,411	3,89	1,14	0,660
72	Culture n° 1	0	3,459	5,38	1,52	0,912
	Culture n° 2	»	3,534	5,22	1,58	0,885
	Culture n° 3	»	3,480	5,42	1,56	0,919
	Moyennes	»	3,491	5,34	1,55	0,905
96	Culture n° 1	0	2,904	4,82	1,66	0,817
	Culture n° 2	»	2,901	4,79	1,65	0,812
	Culture n° 3	»	2,886	4,87	1,69	0,825
	Moyennes	»	2,897	4,82	1,67	0,818
120	Culture n° 1	0	2,305	4,02	1,74	0,681
	Culture n° 2	»	2,270	3,60	1,59	0,610
	Culture n° 3	»	2,134	4,12	1,89	0,698
	Moyennes	»	2,236	3,91	1,74	0,663

$Mg\ m$

* Le rapport $\frac{Mg\ m}{Mg\ c}$ est le rapport du magnésium contenu dans le mycelium au magnésium distribué dans 150 cc. de solution nutritive

magnésium s'engagent avec un certain retard dans ces phénomènes de simplification. En effet, à 120 heures, terme de nos expériences, le mycelium a perdu le tiers du poids maximum de sa substance sèche alors qu'entre 72 et 120 heures le poids du magnésium diminue seulement de 1,4 mg., soit $1/3,7$ du poids maximum contenu dans le champignon.

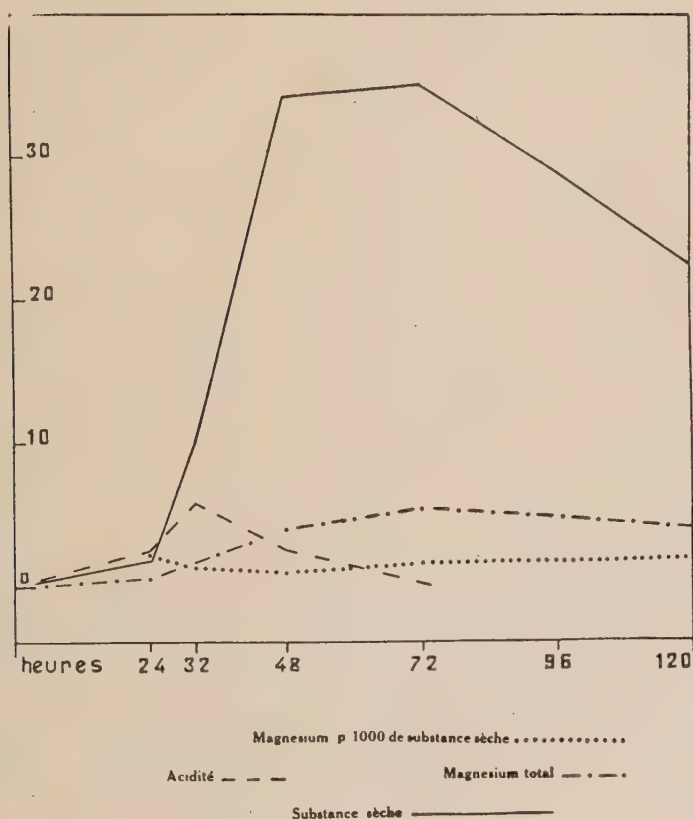


Fig. 7. — Variation du MAGNÉSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium (substance sèche en dg., magnésium en mg., acidité en c.c. de soude normale.)

TABLEAU XVII

Variation du MAGNÉSIUM dans le mycelium de Sterigmatocystis nigra cultivé sur milieu au CHLORURE D'AMMONIUM

Age des cult.	Désignation des cultures	Acidité totale d'une culture	Poids de sub- stance sèche	Magnésium		<i>Mg m</i> <i>Mg c</i>
				contenu dans le mycel.	p. 1.000 de subst. sèche	
h.		cc. de soude norm.	gr.	mg.		*
24	Culture n° 1	2,8	0,269	0,47	1,74	0,080
	Culture n° 2	»	0,255	0,52	2,04	0,088
	Moyennes	»	0,262	0,50	1,89	0,084
32	Culture n° 1	7,3	1,126	0,73	0,65	0,124
	Culture n° 2	»	1,108	0,79	0,71	0,134
	Culture n° 3	»	1,020	0,74	0,72	0,125
	Moyennes	»	1,084	0,75	0,69	0,128
48	Culture n° 1	11,5	2,593	0,63	0,24	0,107
	Culture n° 2	»	2,441	0,21	0,09	0,035
	Culture n° 3	»	2,391	0,32	0,13	0,054
	Moyennes	»	2,479	0,39	0,15	0,065
72	Culture n° 1	13,5	3,075	0,57	0,18	0,096
	Culture n° 2	»	3,072	0,52	0,17	0,088
	Culture n° 3	»	3,072	0,94	0,30	0,159
	Moyennes	»	3,073	0,68	0,22	0,114
96	Culture n° 1	13,4	3,033	0,68	0,22	0,115
	Culture n° 2	»	3,027	0,47	0,15	0,081
	Culture n° 3	»	2,962	0,05	0,02	0,008
	Moyennes	»	3,030	0,57	0,18	0,098
120	Culture n° 1	11,9	2,860	0,26	0,09	0,044
	Culture n° 2	»	2,860	0,21	0,07	0,035
	Culture n° 3	»	2,825	0,57	0,20	0,097
	Moyennes	»	2,848	0,34	0,12	0,058

* Le rapport $\frac{Mg\ m}{Mg\ c}$ exprime le rapport du magnésium contenu dans le mycelium au magnésium distribué dans 150 cc. de solution nutritive.

Sur milieu au chlorure d'ammonium (Tableau XVII, fig. 8), l'influence de l'acidité intervient sur le magnésium comme l'a signalé MOLLIARD (67) d'une manière particulièrement intense. A 24 heures, la masse de magnésium absorbée est identique sur milieu au chlorure ou sur milieu au tartrate d'ammonium, bien que la proportion de magnésium par rapport à la substance

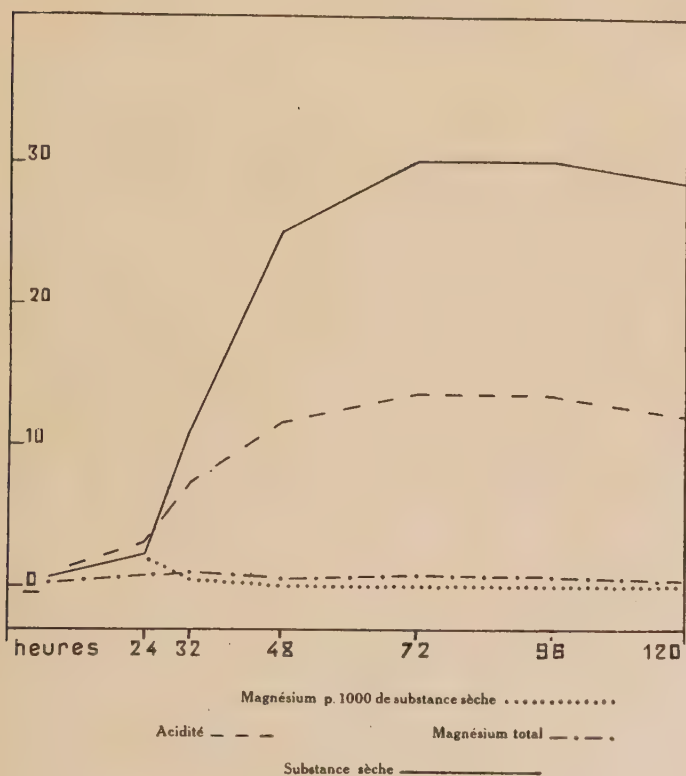


Fig. 8. — Variation du MAGNÉSIUM dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au chlorure d'ammonium (substance sèche en dg., magnésium en mg., acidité en c.c. de soude normale.)

sèche soit un peu plus faible en raison de l'action favorable de l'acidité sur le début de la végétation. Mais, dès 32 heures, le poids maximum de magnésium absorbé par le mycelium est atteint. Il ne dépasse pas le $1/8^e$ du magnésium existant dans le milieu et sera ramené au $1/20^e$ vers 120 heures.

Indirectement, en recommandant d'augmenter la dose de magnésium, BENECKE (3) met en évidence la difficulté de pénétration du magnésium en milieu acide.

De plus, sur milieu au tartrate d'ammonium, les nombres exprimant le poids de magnésium absorbé sont à peu près les mêmes pour un même stade de la vie du champignon. Il en est tout autrement sur milieu au chlorure d'ammonium où ces nombres sont en complète discordance : c'est ainsi qu'à 48 heures (Tableau XVII) les teneurs de la substance sèche en magnésium dans les trois cultures analysées sont entre elles comme les nombres 24, 9 et 13; pour les autres stades du développement, on observe des variations du même ordre de grandeur. Cela témoigne de la perturbation provoquée par l'acidité du milieu dans la formation des composés magnésiens.

N'existerait-il pas une relation entre cette pauvreté en magnésium du mycelium sur milieu au chlorure d'ammonium et le fait que l'autolyse n'apparaît que plus tard? Rien ne nous permet de l'assurer. Rappelons cependant les recherches de TRIBOT (92) sur l'influence que possède le magnésium sur la transformation du saccharose, une sucrase privée de magnésium agissant d'une façon beaucoup moins active sur la transforma-

tion du sucre. Citons aussi les recherches de CANALS (13) constatant que, sur milieu privé de magnésium, il ne se produit pas de sucre réducteur. Evidemment, les différents glucides du mycelium ont une complexité telle qu'il est difficile de les comparer au saccharose, mais il semble cependant qu'on puisse se permettre un rapprochement.

CHAPITRE XI

NUTRITION MINÉRALE DU « STERIGMATOCYSTIS NIGRA »

Interprétation des résultats précédents

Nous pouvons à présent jeter un coup d'œil d'ensemble sur la nutrition minérale du *Sterigmatocystis nigra* dans les conditions où nous l'avons étudiée.

Suivant les réactions du milieu, l'aspect du mycelium est très différent. Aux premiers stades de la culture, jusque vers 32 heures, il est difficile de distinguer une culture sur milieu au tartrate d'une autre sur milieu au chlorure d'ammonium, sauf que le champignon cultivé sur milieu plus acide présente un développement plus important. A partir de 48 heures, les différences s'accusent : sur milieu au tartrate la sporulation s'annonce, le mycelium prend une apparence veloutée tandis que sur milieu au chlorure il garde un aspect rugueux.

A 72 heures, sur milieu au tartrate, le mycelium est couvert de spores d'une couleur brune tirant vers le roux, le liquide prend une teinte légèrement brune. A la récolte, par la manipulation, le mycelium s'agglutine. Sur milieu au chlorure, il reste blanc à la partie supérieure ; la face inférieure se teinte en jaune pâle et le pigment diffuse dans le liquide qui se colore en jaune d'or. A la récolte le mycelium est parcheminé, cassant. Quand les cultures vieillissent, les phénomènes s'accen-

tuent : le mycelium cultivé sur milieu au tartrate devient de plus en plus mou, gélatineux ; le liquide est coloré en brun, trop foncé pour permettre les mesures acidimétriques par les méthodes courantes. Le mycelium cultivé sur milieu au chlorure est de plus en plus cassant, il s'amincit ; pour une durée sortant des limites de nos expériences, il se fragmente dès que l'on agite le vase de culture et se transforme, à la récolte, en une sorte de bouillie dont les éléments ne s'agglomèrent pas. Le liquide reste clair, mais prend une coloration jaune vif de plus en plus intense.

En fait, ces différences d'aspect font pressentir les différences de constitution chimiques que l'analyse met en évidence.

Si nous exceptons le fer et le zinc dont nous ne nous sommes pas occupé, et qui entrent pour une très faible proportion dans la composition de la solution nutritive, le poids total des éléments minéraux atteint au maximum 60 p. 1000 du poids de la substance sèche sur milieu au tartrate contre moins de 30 p. 1000 sur milieu au chlorure. Ce maximum est atteint durant la période de jeunesse qui précède 24 heures.

Si l'acidité légère du milieu au chlorure, au départ de la végétation, favorise la production de la substance sèche, cette acidité se manifeste immédiatement soit en gênant la pénétration des éléments minéraux, soit en entravant la formation des substances dans la composition desquelles entrent les éléments minéraux.

La proportion d'éléments minéraux dans la substance sèche tombe, sur milieu au tartrate, à 30 p. 1000 vers 32 heures pour se fixer ensuite aux environs de 20

p. 1000 avec, pendant la période d'autolyse, un léger accroissement dû au fait que les composés dont les minéraux font partie se consomment moins vite que l'ensemble du mycelium. Sur milieu au chlorure d'ammonium, la proportion d'éléments minéraux est de 30 p. 1000 à 24 heures. Elle décroît régulièrement jusqu'à 96 heures où elle n'est plus que de 10 p. 1000. Elle semble ensuite se relever légèrement, puisqu'elle est de 11,5 p. 1000 à 120 heures. Il eut fallu, pour confirmer cet accroissement, cultiver le *Sterigmatocystis nigra* durant une période plus longue.

La participation des substances minérales à la formation du mycelium n'est pas uniforme dans le temps. Dès le début de la végétation, le phosphore prédomine. C'est l'élément caractéristique de la période d'accroissement. Sur milieu au tartrate aussi bien que sur milieu au chlorure, la teneur en phosphore est maximum au moment où le mycelium atteint son maximum de substance sèche, à 48 heures sur milieu au tartrate, à 72 heures sur milieu au chlorure. Puis le phosphore retourne dans le liquide de culture de sorte que, à 120 heures, le mycelium en contient une masse comparable à celle qui s'y trouvait à 24 heures. Rappelons cependant le rôle très important du phosphore au moment de la formation des spores : sans que le poids de substance sèche subisse de modification importante, le tiers de la masse du phosphore contenu dans le mycelium est rejeté dans le milieu de culture immédiatement après la sporulation.

Le potassium se comporte de façon différente. Il pénètre dans le mycelium un peu plus tard que le phosphore. Mais rapidement, il y prend une place impor-

tante. A 24 heures le champignon cultivé sur milieu au tartrate contient 10,7 mg. de phosphore pour 3,3 mg. de potassium; à 32 heures nous trouvons 17,8 mg. de phosphore pour 19,5 de potassium. L'autolyse, qui réduit si considérablement la teneur du mycelium en phosphore, intéresse peu les substances renfermant du potassium. Sur milieu au chlorure d'ammonium la masse de potassium s'accroît, alors que le poids de substance sèche diminue. Il serait intéressant de rechercher si ce n'est pas au bénéfice des substances associées au potassium que se fait l'autolyse, car, en considérant la pénétration considérable de potassium dans le mycelium entre 24 et 32 heures, il est bien évident que cet élément prend une part importante à la constitution des tissus.

La masse du soufre présente, en valeur absolue comme en valeur relative, une importance moins grande que celle des substances précédentes. Il s'agit évidemment de considérations numériques, et nous n'entendons préjuger en rien du rôle physiologique du soufre. Sur milieu au tartrate comme sur milieu au chlorure, le soufre pénètre dans le mycelium progressivement. Il ne semble pas jouer un rôle particulièrement actif dans la formation des spores et, de 48 à 72 heures, sur milieu au tartrate, il continue à pénétrer dans le mycelium. Il participe ensuite à l'autolyse, mais d'une manière moins importante, de telle sorte que sa proportion dans la substance sèche augmente légèrement jusqu'à 120 heures. Sur milieu au chlorure, le soufre atteint son poids maximum à 72 heures, mais l'autolyse des substances sulfurées paraît moins gênée par l'acidité

que celle des autres substances du mycelium, de sorte que la proportion de soufre dans la substance sèche est minimum à 120 heures.

Sur milieu au tartrate, le magnésium se comporte comme le soufre. Il pénètre progressivement dans le mycelium, atteint vers 72 heures son poids maximum, puis s'élimine plus lentement que l'ensemble de la substance sèche, de sorte que c'est à 120 heures que la proportion de magnésium dans le champignon est maximum. Sur milieu au chlorure, ainsi que nous l'avons indiqué déjà, c'est le magnésium qui réagit le plus violemment sous l'effet de l'acidité et, depuis le début de la végétation, il est éliminé du mycelium avec une telle intensité que sa proportion à 120 heures ne dépasse pas 0,12 p. 1000 de la substance sèche. A 120 heures, sur milieu au tartrate, le poids du magnésium représente $1/12^e$ du poids total des éléments minéraux; sur milieu au chlorure ce rapport n'est plus que de $1/100^e$: la comparaison de ces deux rapports se passe de commentaires.

OSTERHOUT (76-77-78), en 1906, étudiant l'influence réciproque de divers composés sur la pénétration de chacun d'eux à travers la membrane cytoplasmique de végétaux marins, introduit la notion de solutions équilibrées. Il devient évident que la valeur alimentaire d'une solution est fonction non seulement de sa composition chimique, mais encore de l'action réciproque de ses éléments.

MOLLIARD (67) pose la question de savoir dans quelle mesure les solutions nutritives proposées par RAULIN et

ses successeurs correspondent aux besoins réels des végétaux cultivés sur ces milieux.

La réponse à cette question suppose l'étude systématique d'un milieu dont on fait varier successivement les composants; nous n'espérons donc pas y répondre définitivement. Mais nos résultats permettent de fournir une indication.

Pour 150 c.c. de solution nutritive, nous avons distribué :

9,3 mg. de soufre.
32,48 mg. de phosphore.
40,86 mg. de potassium.
5,9 mg. de magnésium.

Au moment où il contient la quantité maximum de chacun de ces éléments minéraux, vers 48 heures ou 72 heures, sur milieu au tartrate d'ammonium, le mycelium renferme :

7,13 mg. de soufre.
29,7 mg. de phosphore.
32,81 mg. de potassium.
5,34 mg. de magnésium.

En fonction du potassium, élément dont le poids absolu est le plus élevé nous avons donc :

Dans le milieu de culture	{	Potassium.	1000
		Soufre.	224
		Phosphore.	782
		Magnésium.	142
Dans le mycelium	{	Potassium.	1000
		Soufre.	217
		Phosphore.	905
		Magnésium.	163

Manifestement, le milieu que nous avons utilisé est

pauvre en phosphore et en magnésium. La proportion de soufre, par contre, y est satisfaisante. Il est donc probable que nous aurions obtenu un rendement plus élevé en augmentant de $1/7^{\circ}$ le poids de magnésium et de $1/5^{\circ}$ le poids de phosphore mis à la disposition du *Sterigmatocystis nigra*, les poids de potassium et de soufre restant les mêmes. C'est une hypothèse qui reste à vérifier.

CHAPITRE XII

INFLUENCE DE LA VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ DU MILIEU SUR L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE

Afin de rendre plus évidente l'action de l'acidité sur la nutrition minérale du *Sterigmatocystis nigra*, nous avons cultivé ce champignon sur milieu au tartrate d'ammonium. Puis, à 24 heures, nous avons introduit brusquement dans le milieu nutritif des doses variées d'acide chlorhydrique. Nous avons suivi l'effet de l'acidité sur l'assimilation du phosphore, cette substance s'étant montrée la plus sensible au cours de nos études précédentes.

Des flacons, par série de seize, sontensemencés et récoltés deux à deux à des intervalles de temps convenablement choisis pour permettre une étude facile de l'action de l'acidité. Ces intervalles ne sont pas forcément les mêmes, car l'évolution du champignon est beaucoup plus lente lorsque l'acidité du milieu s'accroît.

Série recevant 3 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon (Tableau XVIII, fig. 9). — A 24 heures, une première série de flacons reçoit un supplément d'acidité de 3 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon. L'acidité de chaque flacon qui correspondait à 3,7 c.c. d'acide normal se trouve portée instantanément à 6,7 c.c. Très rapidement, le champignon réagit et 24 heures après, l'acidité est ramenée à 4,65 c.c. par flacon. Le poids

TABLEAU XVIII
INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture, de 3 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. de soude norm.	g.	mg.		*
1	0	Culture n° 1	3,70+3	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	=6,70	0,364	10,90	29,98	0,33
		Moyennes	»	0,372	10,77	32,59	0,33
2	1	Culture n° 1	4,65	3,723	30,50	8,20	0,94
		Culture n° 2	»	3,520	31,00	8,80	0,95
		Moyennes	»	3,621	30,70	8,50	0,94
3	2	Culture n° 1	1,15	3,439	28,40	8,26	0,87
		Culture n° 2	»	3,432	28,30	7,70	0,87
		Moyennes	»	3,435	28,30	7,98	0,87
4	3	Culture n° 1	0,90	2,982	18,80	6,30	0,58
		Culture n° 2	»	2,844	19,25	6,77	0,59
		Moyennes	»	2,913	19,02	6,53	0,58
5	4	Culture n° 1	0,85	2,172	16,95	7,80	0,53
		Culture n° 2	»	2,051	15,40	7,51	0,48
		Moyennes	»	2,111	16,17	7,65	0,55
7	6	Culture n° 1	0,57	1,391	13,35	9,59	0,41
		Culture n° 2	»	1,289	13,80	10,70	0,42
		Moyennes	»	1,340	13,57	10,14	0,41
10	9	Culture n° 1	0	1,150	9,00	7,80	0,28
		Culture n° 2	»	1,043	9,50	9,10	0,29
		Moyennes	»	1,096	9,25	8,45	0,28
13	12	Culture n° 1	0	1,108	7,80	7,20	0,24
		Culture n° 2	»	0,992	9,45	9,50	0,29
		Moyennes	»	1,050	8,62	8,35	0,26

$\frac{Pm}{Pc}$

* Le rapport $\frac{Pm}{Pc}$ est le rapport du phosphore contenu dans le mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutritive.

maximum de substance sèche s'élève à 3,621 gr.; il est donc un peu supérieur au poids de substance sèche fournie par le lot témoin sur milieu au tartrate d'ammonium, sans addition d'acide. Au 3^e jour, l'acidité est

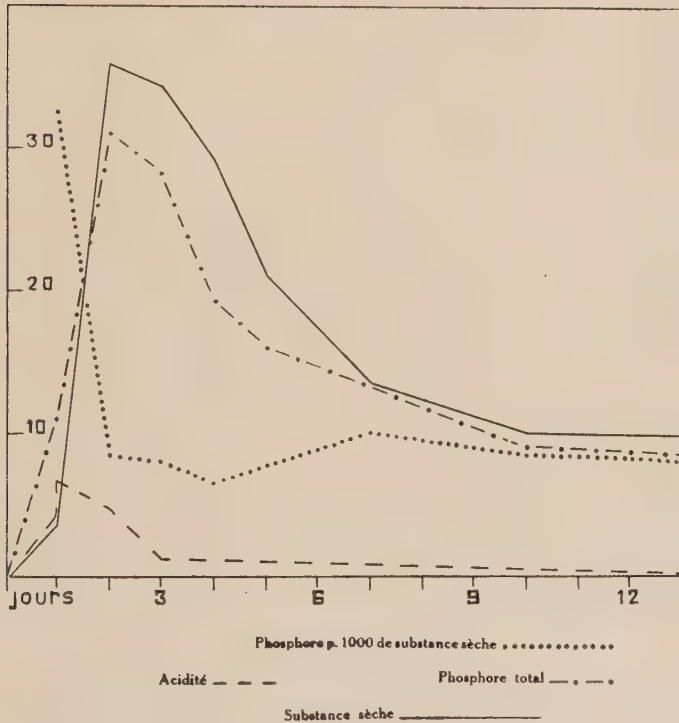


Fig. 9. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 3 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

réduite à 1,15 c.c. d'acide normal et la sporulation débute. Elle se poursuit le jour suivant; les spores sont franchement noires, et non grisâtres comme sur milieu

au tartrate non acidifié, mais beaucoup moins abondantes. Le fonds blanc du mycelium reste visible à travers les spores. Le mycelium dont la face inférieure se tache de jaune est parcheminé, cassant, jusqu'au début de l'autolyse. Il se ramollit alors, tandis que le liquide de culture prend une teinte brune de plus en plus foncée. Le phosphore pénètre dans le mycelium avec autant de facilité qu'en milieu non acide. Il diminue d'une manière importante au moment de la sporulation. Mais l'autolyse des substances phosphorées est très ralentie et, au bout de 10 jours, le mycelium renferme encore 9,25 mg. de phosphore pour 1,096 gr. de substance sèche. Sur milieu au tartrate, à 5 jours, le poids de phosphore n'était que de 9,88 mg. alors que la substance sèche du champignon pesait encore 1,828 gr.

Procédant d'une manière analogue, nous avons distribué dans d'autres séries de flacons de culture des doses croissantes d'acide chlorhydrique normal. Renvoyant aux tableaux et aux courbes pour le détail des expériences, nous nous contenterons d'indiquer les faits les plus saillants.

Série de flacons recevant à 24 heures 4,5 c.c. d'acide chlorhydrique normal (Tableau XIX, fig. 10). — L'acidité se trouve instantanément portée à 8,2 c.c. d'acide normal par flacon. Le champignon réagit et, le lendemain, l'acidité est de 7,75 c.c. Elle tombe à 1,8 c.c. le quatrième jour et la sporulation débute. Cette sporulation est plus faible que celle de la série précédente. Le mycelium est cassant, fragile et largement taché de jaune à sa face inférieure.

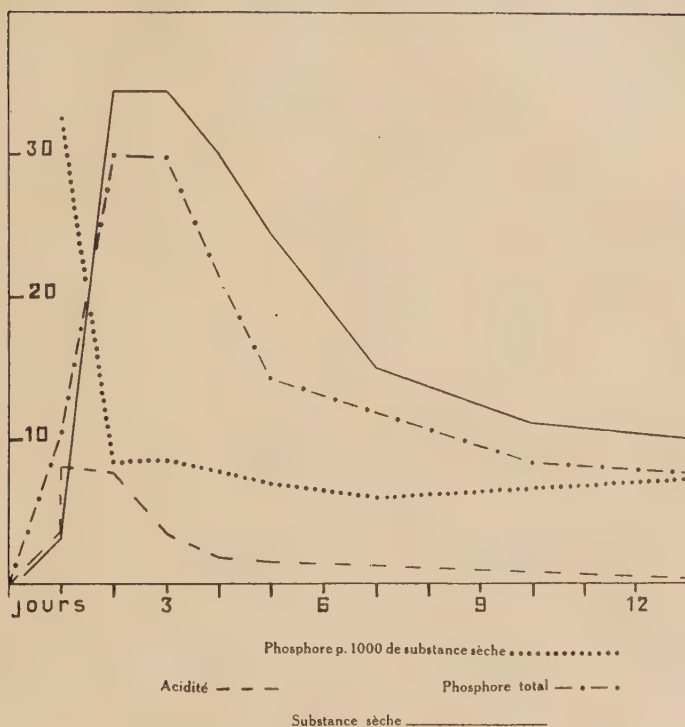


Fig. 10. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 4,5 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

La dose maximum de phosphore contenu dans le mycelium s'élève à 29,9 mg. et représente alors 8,65 p. 1000 de la substance sèche.

Série de flacons recevant à 24 heures 6 c.c. d'acide chlorhydrique normal (Tableau XX, fig. 11). — L'acidité se trouve portée à 9,7 lors de l'addition d'acide. La réaction du champignon est presque nulle : après une journée, l'acidité du milieu est encore de 9,65 c.c. d'acide

TABLEAU XIX
INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture, de 4,5 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. c. de soude norm.	g.	mg.		*
1	0	Culture n° 1	3,70 +	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	4,50	0,364	10,90	29,94	0,33
		Moyennes	= 8,20 »	0,372	10,77	32,59	0,33
2	1	Culture n° 1	7,75	3,465	29,80	8,60	0,92
		Culture n° 2	»	3,421	30,10	8,21	0,92
		Moyennes	»	3,443	29,90	8,40	0,92
3	2	Culture n° 1	3,50	3,460	29,50	8,53	0,91
		Culture n° 2	»	3,441	30,20	8,77	0,93
		Moyennes	»	3,450	29,80	8,65	0,92
4	3	Culture n° 1	1,80	3,115	22,00	7,06	0,68
		Culture n° 2	»	3,082	21,30	6,91	0,66
		Moyennes	»	3,098	21,60	6,98	0,67
5	4	Culture n° 1	1,55	2,504	14,00	5,59	0,43
		Culture n° 2	»	2,383	14,65	6,14	0,45
		Moyennes	»	2,443	14,32	5,86	0,44
7	6	Culture n° 1	0,40	1,551	17,95	11,57	0,55
		Culture n° 2	»	1,483	16,50	11,13	0,51
		Moyennes	»	1,517	17,22	11,35	0,53
10	9	Culture n° 1	0	1,190	9,30	7,81	0,29
		Culture n° 2	»	1,051	7,75	7,37	0,24
		Moyennes	»	1,120	8,52	7,59	0,26
13	12	Culture n° 1	0,10	1,039	7,15	6,88	0,22
		Culture n° 2	»	1,012	8,30	8,20	0,25
		Moyennes	»	1,025	7,72	7,54	0,23

$\frac{Pm}{Pc}$

* Le rapport $\frac{Pm}{Pc}$ est le rapport du phosphore contenu dans le mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutri-

TABLEAU XX

INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture, de 6 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. c. de soude norm.	g.	mg.		
1	0	Culture n° 1	3,70 + 6	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	= 9,70	0,364	10,90	29,94	0,33
		Moyennes	»	0,372	10,77	32,59	0,33
2	1	Culture n° 1	9,65	2,912	25,00	8,58	0,77
		Culture n° 2	»	2,666	22,80	8,55	0,70
		Moyennes	»	2,789	23,90	8,56	0,73
3	2	Culture n° 1	6,05	3,274	28,25	8,63	0,87
		Culture n° 2	»	3,232	27,75	8,59	0,85
		Moyennes	»	3,253	28,00	8,61	0,86
4	3	Culture n° 1	3,95	3,035	24,25	8,00	0,75
		Culture n° 2	»	2,902	24,85	8,56	0,76
		Moyennes	»	2,968	24,55	8,28	0,75
5	4	Culture n° 1	2,45	2,803	17,75	6,33	0,55
		Culture n° 2	»	2,775	17,25	6,22	0,53
		Moyennes	»	2,789	17,50	6,27	0,54
7	6	Culture n° 1	0,97	2,320	11,80	5,08	0,36
		Culture n° 2	»	2,278	10,50	4,61	0,32
		Moyennes	»	2,299	11,10	4,84	0,34
10	9	Culture n° 1	0	1,415	11,40	8,06	0,35
		Culture n° 2	»	1,406	11,60	8,25	0,36
		Moyennes	»	1,410	11,50	8,15	0,35
13	12	Culture n° 1	0	1,302	10,85	8,33	0,33
		Culture n° 2	»	1,203	11,90	9,89	0,37
		Moyennes	»	1,252	11,37	9,11	0,35

$\frac{Pm}{Pc}$

* Le rapport — est le rapport du phosphore contenu dans le
mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutri-
tive.

normal par flacon. La sporulation s'amorce faiblement le 4^e jour pour une acidité de 3,95 c.c. par flacon, elle est nette les jours suivants, mais reste peu importante. Les spores formant une revêtement discontinu, la face

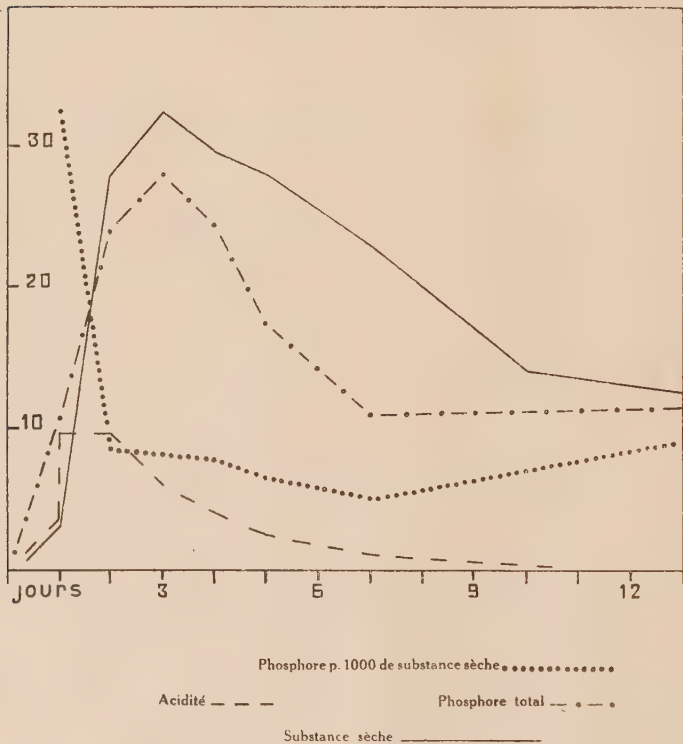


Fig. 11. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 6 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

supérieure du mycelium prend un aspect tigré; la face inférieure est tachée de jaune. Au 10^e jour de culture, l'acidité est nulle : le mycelium est mou et son disque

s'est rétréci à 1 cm. des bords du vase. Le liquide est brun. La dose maximum de phosphore contenu dans le mycelium est de 28 mg. et représente 8,61 p. 1000 de la substance sèche.

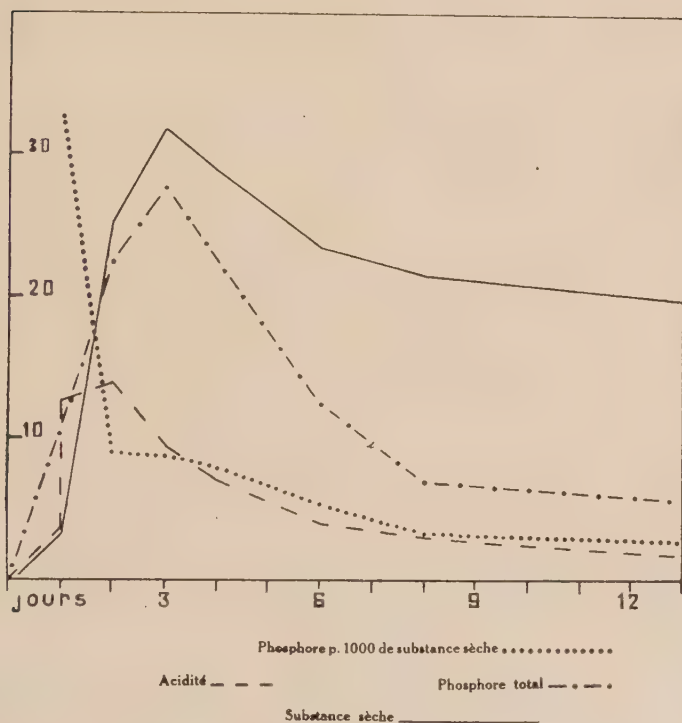


Fig. 12. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 9 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

Série de flacons recevant 9 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon (Tableau XXI, fig. 12). — L'acidité à 24 heures est instantément portée à 12,7 c.c. d'acide normal. Un fait nouveau apparaît : la réaction du

TABLEAU XXI

INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture, de 9 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. c. de soude norm.	g.	mg.		*
1	0	Culture n° 1	3,70+9	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	= 12,70	0,364	10,90	29,94	0,33
		Moyennes	»	0,372	10,77	32,59	0,33
2	1	Culture n° 1	13,80	2,517	22,50	8,94	0,69
		Culture n° 2	»	2,512	22,30	8,88	0,68
		Moyennes	»	2,514	22,40	8,86	0,68
3	2	Culture n° 1	9,55	3,186	28,25	8,87	0,87
		Culture n° 2	»	3,147	27,00	8,58	0,83
		Moyennes	»	3,166	27,62	8,72	0,85
4	3	Culture n° 1	6,90	2,924	22,55	7,73	0,69
		Culture n° 2	»	2,825	22,00	7,79	0,67
		Moyennes	»	2,874	22,27	7,76	0,68
6	5	Culture n° 1	3,80	2,401	12,85	5,35	0,40
		Culture n° 2	»	2,283	12,15	5,32	0,37
		Moyennes	»	2,342	12,50	5,33	0,38
8	7	Culture n° 1	3,10	2,195	6,65	3,03	0,20
		Culture n° 2	»	2,107	7,10	3,45	0,22
		Moyennes	»	2,151	6,87	3,24	0,21
12	11	Culture n° 1	2,10	2,096	5,45	2,60	0,17
		Culture n° 2	»	1,938	6,10	3,18	0,19
		Moyennes	»	2,017	5,77	2,89	0,18
16	15	Culture n° 1	2,35	2,048	5,00	2,44	0,15
		Culture n° 2	»	1,936	4,50	2,32	0,14
		Moyennes	»	1,992	4,75	2,38	0,14

$\frac{Pm}{Pc}$

* Le rapport — est le rapport du phosphore contenu dans le
mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutri-
tive.

TABLEAU XXII

INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture de 12 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. c. de soude norm.	g.	mg.		*
1	0	Culture n° 1	3,70 +	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	12	0,364	10,90	29,94	0,33
		Moyennes	= 15,70 »	0,372	10,77	32,59	0,33
2	1	Culture n° 1	20,90	2,348	22,00	9,39	0,68
		Culture n° 2	»	2,355	21,45	9,11	0,66
		Moyennes	»	2,351	21,72	9,25	0,67
3	2	Culture n° 1	15,60	3,032	26,40	8,70	0,81
		Culture n° 2	»	3,114	25,00	8,02	0,77
		Moyennes	»	3,073	25,70	8,36	0,79
4	3	Culture n° 1	11,25	3,012	22,00	7,30	0,68
		Culture n° 2	»	3,035	25,00	8,23	0,77
		Moyennes	»	3,023	23,50	7,76	0,72
6	5	Culture n° 1	7,30	2,616	15,90	6,01	0,50
		Culture n° 2	»	2,769	14,95	5,40	0,46
		Moyennes	»	2,692	15,42	5,70	0,48
8	7	Culture n° 1	6,30	2,409	9,00	3,73	0,28
		Culture n° 2	»	2,476	8,55	3,45	0,26
		Moyennes	»	2,442	8,77	3,59	0,27
12	11	Culture n° 1	5,50	2,147	4,45	2,07	0,14
		Culture n° 2	»	2,221	6,00	2,72	0,18
		Moyennes	»	2,184	5,22	2,39	0,16
16	15	Culture n° 1	4,30	1,831	3,75	2,05	0,12
		Culture n° 2	»	1,986	4,45	2,31	0,14
		Moyennes	»	1,908	4,10	2,18	0,13

* Le rapport $\frac{Pm}{Pc}$ est le rapport du phosphore contenu dans le
mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutri-
tive.

champignon n'est plus immédiate. Bien mieux, l'acidité augmente, elle est de 13,8 c.c. d'acide normal après une journée. La réaction se produit alors, ramenant l'acidité à 9,55 c.c. le 3^e jour et à 3,8 c.c. le 6^e jour où com-

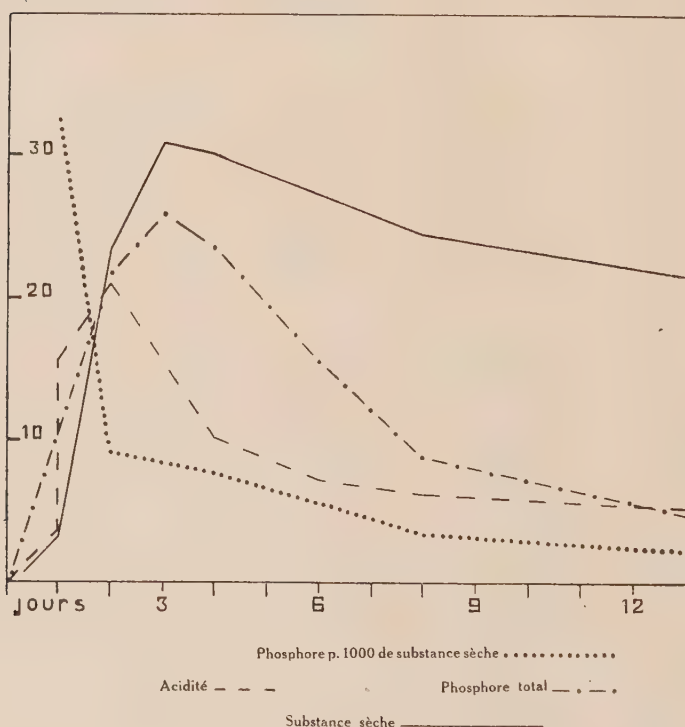


Fig. 13. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 12 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

mence une faible sporulation. Celle-ci se poursuit les jours suivants. Au 16^e jour, l'acidité est de 2,3 c.c. Le mycelium reste cassant, sa face inférieure porte de

grandes taches d'un jaune orangé vif; le liquide de culture reste clair, mais teinté en jaune par le pigment du champignon.

Le phosphore du mycelium représente une dose maximum de 27,6 mg. et correspond à 8,72 p. 1000 de la substance sèche.

Série de flacons recevant 12 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon (Tableau XXII, fig. 13). — L'acidité après 24 heures est portée d'un seul coup à 15,7 c.c. d'acide normal par flacon. Cette acidité augmente, pour atteindre 20,9 c.c. d'acide normal le lendemain. Ce supplément d'acidité est neutralisé, l'acidité du milieu revient au 3^e jour à 15,6 c.c. d'acide normal. La sporulation s'amorce le 8^e jour, l'acidité du milieu étant de 6,3 c.c. normal. La sporulation est très faible et les spores sont disséminés par petites taches à la surface du mycelium. Au 16^e jour, l'acidité est encore de 4,3 c.c. d'acide normal par flacon.

La dose maximum de phosphore du mycelium s'élève à 25,7 mg. et représente 8,36 p. 1000 de substance sèche.

Série recevant 20 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon (Tableau XXIII, fig. 14). — L'acidité à 24 heures se trouve élevée à 23,7 c.c. et il se produit par la suite une acidité supplémentaire portant à 30,7 c.c. d'acide normal l'acidité d'un flacon. La réaction du champignon est annihilée; après 16 jours de culture, l'acidité du milieu correspond à 33,25 c.c. d'acide normal. Le végétal n'est pas tué; le poids de substance sèche s'accroît lentement; mais la nutrition est complè-

TABLEAU XXIII

INFLUENCE D'UNE VARIATION BRUSQUE DE L'ACIDITÉ SUR
L'ASSIMILATION DU PHOSPHORE (*addition, à 24 heures,*
dans le milieu de culture de 20 c.c. d'HCl normal)

Age des cult.	Temps écoulé depuis l'addit. de l'acide	Désignation des cultures	Acidité totale d'une cult.	Poids de subst. sèche	Phosphore		$\frac{Pm}{Pc}$
					cont. dans le mycel.	p. 1000 de subst. sèche	
jours	jours		c. c. de soude norm.	g.	mg.		*
1	0	Culture n° 1	3,70 +	0,380	10,64	35,25	0,33
		Culture n° 2	20				
		Moyennes	=23,70 »	0,364 0,372	10,90 10,77	29,98 32,59	0,33 0,33
2	1	Culture n° 1	30,70	1,583	10,00	6,32	0,31
		Culture n° 2	»	1,503	9,10	6,06	0,28
		Moyennes	»	1,543	9,55	6,19	0,29
3	2	Culture n° 1	31,00	1,844	6,95	3,77	0,21
		Culture n° 2	»	1,818	7,60	4,18	0,23
		Moyennes	»	1,831	7,27	3,97	0,22
4	3	Culture n° 1	30,80	2,085	5,65	2,71	0,17
		Culture n° 2	»	1,831	4,75	2,59	0,14
		Moyennes	»	1,958	5,20	2,65	0,15
6	5	Culture n° 1	34,70	2,111	4,65	2,20	0,14
		Culture n° 2	»	1,959	3,75	1,91	0,11
		Moyennes	»	2,035	4,20	2,05	0,12
8	7	Culture n° 1	33,35	2,315	3,95	1,70	0,12
		Culture n° 2	»	2,035	4,00	1,96	0,12
		Moyennes	»	2,175	3,97	1,83	0,12
12	11	Culture n° 1	35,50	2,454	4,50	1,83	0,13
		Culture n° 2	»	2,151	3,75	1,74	0,11
		Moyennes	»	2,302	4,12	1,78	0,12
16	15	Culture n° 1	33,25	2,552	4,00	1,57	0,12
		Culture n° 2	»	2,300	3,55	1,54	0,11
		Moyennes	»	2,426	3,77	1,55	0,11

$\frac{Pm}{Pc}$

* Le rapport $\frac{Pm}{Pc}$ est le rapport du phosphore contenu dans le mycelium au phosphore distribué dans 150 c. c. de solution nutritive.

tement modifiée. A partir de 24 heures la quantité de phosphore contenue dans le mycelium diminue constamment : elle ne représente plus, au 16^e jour, que 1,5

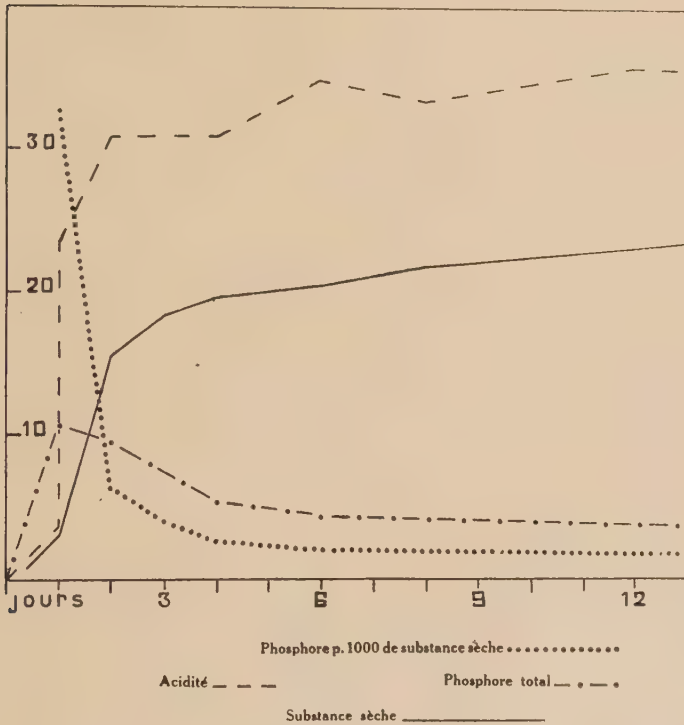


Fig. 14. — Variation du PHOSPHORE dans le mycelium de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium additionné à 24 heures d'une dose de 20 c.c. d'HCl normal par culture (substance sèche en dg., phosphore en mg., acidité en c.c. de soude normale).

p. 1000 de la substance sèche. Par la suite, le champignon s'immerge dans le liquide.

Nous avons remplacé aseptiquement le milieu acide par 150 c.c. de milieu au tartrate d'ammonium. Le

champignon n'a repris aucune vitalité. Nous pensons, étant donné le rôle important du phosphore dans la production de la matière vivante, rôle mis en évidence une fois de plus dans les premiers stades de nos séries de cultures, que le champignon a résisté jusqu'au moment où, par suite de la perte totale des substances phosphorées, la vie a complètement disparu.

De cette série d'expériences sur milieu d'acidité croissante quelques faits se dégagent, qu'il est peut-être intéressant de faire ressortir.

Phosphore. — Une dose d'acide ajoutée brusquement au milieu de culture ne gêne pas sensiblement la pénétration du phosphore. Le mycelium sur milieu au tartrate non acidifié contient au maximum 29,7 mg. de

TABLEAU XXIV
CONSTANCE DE LA PROPORTION DE PHOSPHORE

Acide chlorhydrique normal ajouté à 24 heures	Poids maxim. de phosphore absorbé	Poids de la substance sèche	Proportion de phosp. p. 1.000 de sub. sèche
c. c.	mg.	g.	
0	29,7	3,458	9,1
3	30,7	3,621	8,5
4,5	29,9	3,450	8,6
6	28,0	3,253	8,6
9	27,6	3,166	8,7
12	25,7	3,073	8,3

phosphore; après un apport supplémentaire de 12 c.c. d'acide chlorhydrique normal à 24 heures, le poids maximum de phosphore du mycelium est encore de

25,7 mg. Le maximum de phosphore coïncide toujours avec le maximum de substance sèche et, comme le montre le tableau XXIV, le mycelium renferme alors une proportion constante de phosphore. Il y a toujours, au moment de la sporulation, une chute de la teneur du mycelium en phosphore. Cette perte de phosphore dépasse, proportionnellement, la perte de substance sèche et son ordre de grandeur donne une idée de l'intensité de la sporulation (Tableau XXV).

TABLEAU XXV
RAPPORT ENTRE LA DIMINUTION DU PHOSPHORE ET LA
SPORULATION

Acide chlorhydrique normal ajouté à 24 h.	Epoque de la sporulation	Importance de la sporulation	Diminution du phosphore	Acidité totale du milieu au début de la sporulation
c. c.	jours		mg.	c. c. d'acide normal par flacon
0	2 à 3	normale	10,65	1,50
3	3 à 4	normale	9,28	1,15
4,5	4 à 5	moyenne	7,28	1,80
6	4 à 5	faible	7,05	3,95
9	5 à 6	plus faible	5,30	5,00
12	5 à 8	très faible	2,20	6,30

Fructification. — En plus des observations précédentes concernant le phosphore, la sporulation donne lieu à quelques remarques. Les spores sont beaucoup plus noires sur milieu acidifié que sur milieu au tartrate non acide. La fructification tarde d'autant plus et elle est d'autant plus faible que l'acidité totale du milieu est plus considérable. Mais le champignon parvient à pro-

duire des spores sur solution nutritive de plus en plus acide. Il eut été intéressant de vérifier le pouvoir germinatif de ces spores.

Optimum d'acidité. — Une acidité modérée favorise la formation de la substance sèche. Cette acidité, à 24 heures, dans les conditions de notre travail, correspond à 6,7 c.c. de soude normale par culture.

Substance sèche. — Le poids maximum de la substance sèche est atteint le 3^e jour de culture, quelles que soient les conditions d'acidité du milieu, à condition cependant que cette acidité ne soit pas toxique.

Autolyse. — L'autolyse du champignon est retardée par l'acidité du milieu. Alors que sur milieu normal, au tartrate d'ammonium, plus du tiers de la substance sèche disparaît entre le 3^e et le 5^e jour de culture, il faut arriver au 7^e jour pour trouver un résultat analogue sur milieu recevant 6 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon et au 16^e jour pour que le mycelium cultivé en présence d'une acidité supplémentaire de 12 c.c. d'acide normal par flacon parvienne au même stade.

Ce retard à l'autolyse est beaucoup moins accentué pour les substances phosphorées. Alors que, sur milieu au tartrate, le poids de phosphore est encore le tiers du poids maximum du phosphore absorbé et représente 5,4 p. 1000 du poids d'un mycelium de 5 jours pesant 1,854 gr., nous ne trouvons plus, chez le mycelium de 16 jours pesant 1,908 gr., cultivé sur milieu recevant 12 c.c. d'acide chlorhydrique normal, que le sixième du

poids de phosphore absorbé, correspondant à 2,20 p. 1000 de la substance sèche.

Durant l'autolyse sur milieu acidifié, le mycelium se rétrécit et s'éloigne des bords du vase de culture.

Acidité supplémentaire. — Il se produit, à partir d'une certaine limite d'acidité, une acidité supplémentaire sur laquelle nous reviendrons plus loin.

CHAPITRE XIII

EVOLUTION DU « *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* » EN FONCTION DE L'ACIDITÉ DU MILIEU DE CULTURE

L'étude du *Sterigmatocystis nigra* en fonction de l'acidité du milieu de culture a fait l'objet de nombreux travaux. BACH (1) les a rappelés; nous nous bornerons à mentionner les plus récents ou ceux qui touchent plus particulièrement à notre sujet.

WEBB (94), en 1919, constate que les spores de *Sterigmatocystis nigra* ne germent pas sur un milieu dont le pH est inférieur à 2,5. Cette limite varie d'ailleurs avec la température et le milieu. BACH (1), cultivant *Aspergillus repens*, aboutit à un résultat analogue. Il remarque que la végétation d'*Aspergillus repens*

se poursuit jusqu'au pH 1,8 $\frac{N}{50}$.

MARTIN ROSSET (62) constate que l'acidité optimum pour la culture du *Sterigmatocystis nigra* correspond à pH3; c'est à ce degré d'acidité que la végétation du champignon amène le milieu. En milieu acide, le phosphore semble mieux absorbé par le mycelium.

NIKITINSKY (74), en 1904, montre que si le milieu contient un sel ammoniacal, c'est l'acide de ce sel qui rend toxique les cultures âgées. En neutralisant cette acidité, il est possible d'obtenir de nouvelles récoltes.

KIESEL (52), en 1913, constate qu'en présence d'un acide à radical non assimilable, l'acidité du liquide de culture croît jusqu'à une certaine limite, puis reste constante. La toxicité d'un acide n'est pas seulement fonc-

tion de son ionisation, certains acides organiques peu ionisés se montrant très toxiques. C'est aussi l'opinion de LE RENARD (58). BRENNER (9), après avoir cultivé *Sterigmatocystis nigra* sur un grand nombre de milieux, établit qu'en présence des sels minéraux des acides forts, l'acidité du milieu augmente suffisamment pour rendre impossible, après le 5^e jour, une deuxième culture sur le même milieu. Si la récolte du premier mycelium se fait après le 12^e jour, l'acidité du liquide nutritif a été neutralisée en partie et permet à une nouvelle génération de *Sterigmatocystis nigra* de se développer.

En 1924, TETSU SAKAMURA (90), comparant les rendements du *Sterigmatocystis nigra* en présence de différentes sources d'azote constate que certains composés, agissant comme tampons, affaiblissent dans une certaine mesure l'effet nocif de l'acidité du milieu.

OSTERHOUT (79) établit que l'action des acides sur les plantes marines diminue la perméabilité du protoplasme. MOLLIARD (66) observe que le taux de cendres du *Sterigmatocystis nigra* est plus faible quand le champignon est cultivé sur milieu acide. MOLLIARD (67) remarque que la diminution de la teneur en cendres est le résultat d'un appauvrissement du mycelium en potassium et en magnésium. Il émet l'idée que la stérilité du *Sterigmatocystis nigra* sur milieu acide pourrait provenir d'une inanition minérale, principalement en potassium.

Il nous semble nécessaire de considérer l'influence de l'acidité à un double point de vue; d'une part, l'action du milieu sur le mycelium, d'autre part la réaction du champignon sur le milieu.

Au départ de la végétation, l'action de l'acidité sur le *Sterigmatocystis nigra* est nettement favorable et, très régulièrement, le poids des myceliums de 24 heures sur milieu au chlorure d'ammonium dépasse largement le poids des myceliums de même âge sur milieu au tartrate d'ammonium. Ce gain est-il dû à une germination plus abondante? C'est possible. Nous avons vu précédemment qu'en ajoutant à l'âge de 24 heures, c'est-à-dire après la période germinative, une certaine dose d'acide chlorhydrique, nous avons obtenu le meilleur résultat pour une addition de 3 c.c. d'acide chlorhydrique normal par flacon, l'acidité totale résultant étant de 6,7 c.c. d'acide normal.

A son tour le champignon réagit sur le milieu en épuisant l'ammonium. Il en résulte, sur milieu au chlorure d'ammonium, une augmentation considérable de la concentration de l'acide chlorhydrique. Celle-ci peut atteindre 14,5 c.c. d'acide normal par flacon, soit à peu

N
près — d'acidité totale.
10

En accord avec OSTERHOUT et MOLLIARD, nous constatons que la pénétration des substances minérales, à l'exception du phosphore, est fortement gênée ou, plus exactement, nous constatons qu'à un moment quelconque de son évolution, le mycelium est moins riche en substances minérales. S'agit-il simplement d'une diminution de perméabilité du protoplasme résultant, comme l'ont montré LOEB (61) et GIRARD (44), de modifications provoquées par l'acidité dans l'état électrique de la paroi de la cellule? La grande abondance des cathions provo-

que-t-elle, comme le suggère GENAUD (41), le déplacement des cathions minéraux qui se trouvent dans la cellule? Le métabolisme du *Sterigmatocystis nigra* est-il complètement transformé? Le phénomène nous semble trop complexe pour être provoqué par l'une seulement de ces causes différentes.

L'acidité se manifeste par une diminution de la plupart des éléments minéraux du mycélium, anions ou cathions. Il nous semble légitime d'invoquer en ce sens l'action de la perméabilité.

Il est vraisemblable que les ions H déplacent une partie des cathions de la cellule. Nous observons en effet que l'effet maximum de l'acidité se produit sur l'assimilation du potassium et de magnésium et non sur l'assimilation du phosphore dont la pénétration dans le mycélium n'est pas arrêtée par l'acidité.

Il est indiscutable que le métabolisme du champignon est complètement modifié. Nous en avons pour preuve le rôle très différent du phosphore sur un milieu au tartrate et sur milieu au chlorure d'ammonium. L'élimination presque complète du magnésium en est un autre témoignage. De plus, BOAS (8) a constaté qu'à partir du pH 2,8, le *Sterigmatocystis nigra* forme un amidon soluble. Le phosphore pourrait peut-être, sur milieu acide, donner naissance à des combinaisons dont l'utilisation au moment de la sporulation est impossible.

BUCHNER, d'après SCHOEN (85), a établi que l'acidité arrête l'action de la diastase agissant dans la fermentation alcoolique. FLEURY (35), étudiant la laccase, admet une hypothèse de COLIN et Mlle CHAUDUN, et constate que cette diastase agit à un pH optimum en

dehors duquel elle fonctionne mal, bien que n'étant pas détruite. Faut-il rapprocher ces faits de ce qui se passe durant l'autolyse du *Sterigmatocystis nigra*? Chez ce champignon cultivé sur milieu au chlorure d'ammonium, la disparition des substances ternaires est très ralentie et, sans préjuger de la cause exacte, tout se passe

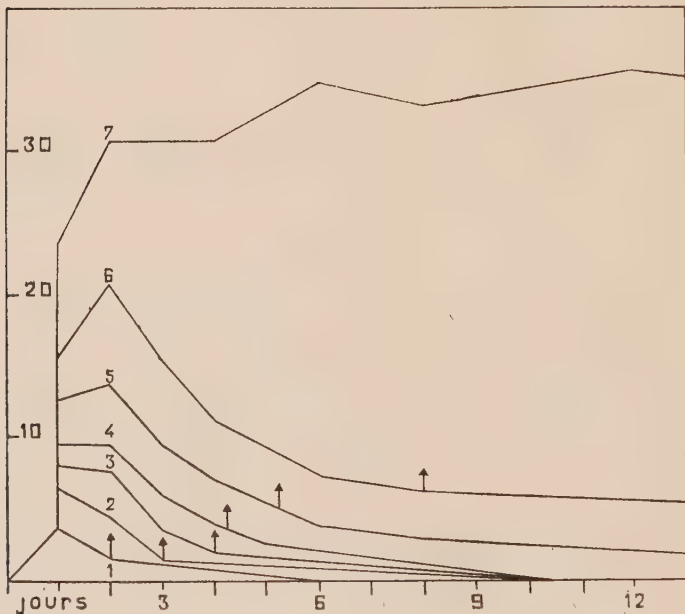


Fig. 15. — Variation de L'ACIDITÉ du milieu de culture de *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur milieu au tartrate d'ammonium auquel on ajoute à 24 heures, par flacon :

1	—	0	c.c. d'acide chlorhydrique normal
2	—	3	c.c. » » »
3	—	4,5	c.c. » » »
4	—	6	c.c. » » »
5	—	9	c.c. » » »
6	—	12	c.c. » » »
7	—	20	c.c. » » »

Les flèches placées sur la courbe indiquent le début de la sporulation.

comme si l'acidité empêchait ou ralentissait une réaction aboutissant à la désagrégation des sucres.

Ceci nous ramène indirectement à la production de l'acidité supplémentaire constatée dans certaines cultures par suite de l'addition d'une dose massive d'acide chlorhydrique normal. Le tableau XXVI et le graphique n° 15 donnent une idée de la marche du phénomène.

TABLEAU XXVI
ACIDITÉ SUPPLÉMENTAIRE
PRODUITE PAR L'ADDITION BRUSQUE
D'HCl AU MILIEU DE CULTURE

Age des cult. (j.)	Acidité totale moyenne (en c. c. de soude normale) <i>Chaque culture reçoit à l'âge de 24 heures un supplément de solution normale d'acide chlorhydrique de :</i>						
	0 c. c.	3 c. c.	4,5 c. c.	6 c. c.	9 c. c.	12 c. c.	20 c. c.
1	3,70	3,70 +3 =6,70	3,70 +4,50 =8,20	3,70 +6 =9,70	3,70 +9 =12,70	3,70 +12 =15,70	3,70 +20 =23,70
2	1,50	4,65	7,75	9,65	13,80	20,90	30,70
3	1,20	1,15	3,50	6,05	9,55	15,60	31,00
4	0,90	0,90	1,80	3,95	6,90	11,25	30,80
5	0,50	0,85	1,55	2,45	—	—	—
6	—	—	—	—	3,80	7,30	34,70
7	—	0,57	0,40	0,97	—	—	—
8	—	—	—	—	3,10	6,30	33,35
10	—	0	0	0	—	—	—
12	—	—	—	—	2,10	5,50	35,5
16	—	—	—	—	2,35	4,30	33,25

Nous avons recherché la nature de cet acide supplémentaire qui se trouve être de l'acide oxalique.

KIESEL (52) a observé l'apparition d'acide oxalique chez le *Sterigmatocystis nigra* cultivé en milieu acide.

MOLLIARD (65) a constaté la formation d'acide oxalique dans les circonstances suivantes : des cultures de *Sterigmatocystis nigra* sont faites en milieu neutre, puis quand le champignon atteint le maximum de poids, un certain nombre de myceliums sont transportés aseptiquement sur milieu alcalin, d'autres sur milieu renfermant 13 c.c. d'acide chlorhydrique normal pour 150 c.c. de solution nutritive. Il se forme de l'acide oxalique sur milieu alcalin et aucune trace n'apparaît dans le milieu renfermant de l'acide chlorhydrique. MOLLIARD en conclut qu'il s'agit là d'une réaction du champignon contre l'alcalinité du milieu.

Dans notre travail, c'est en milieu acide que l'acide oxalique apparaît.

Il importe de situer les deux séries d'expériences pour expliquer cette apparente contradiction. Il est vraisemblable d'admettre que l'acide oxalique résulte de l'oxydation incomplète des glucides. Nous avons constaté, au cours de notre travail que, durant l'autolyse, les glucides du mycelium restent à peu près intacts quand l'acidité du milieu est importante. Ces glucides ne se consommant pas, il ne peut se produire d'acide oxalique. C'est le cas des expériences de MOLLIARD qui intéressaient les myceliums possédant un poids élevé de substance sèche, mais placés sur milieu privé de saccharose.

En ce qui nous concerne, nous avons ajouté de l'acide

chlorhydrique à 24 heures, c'est-à-dire au moment où le milieu est riche en saccharose. L'acidité a gêné l'assimilation de ce saccharose. Et l'oxydation se serait arrêtée au stade acide oxalique. Cet acide oxalique est d'ailleurs utilisé, si la toxicité du milieu n'est pas suffisante pour tuer le mycelium. En effet, on ne le retrouve plus quelques jours plus tard, comme le démontre le tableau XXVI et le graphique n° 15. Pour vérifier ce point, nous avons cultivé le *Sterigmatocystis nigra* sur milieu au chlorure d'ammonium jusqu'à l'âge de six jours. A ce stade, le saccharose a disparu et le milieu présente une acidité chlorhydrique correspondant à 14 c.c. de soude normale par flacon. Nous avons introduit dans le liquide de culture 7 g. de saccharose par flacon. Au bout de 24 heures, nous avons trouvé une quantité considérable d'acide oxalique. Notre hypothèse se trouve ainsi justifiée.

MOLLIARD (67) a posé la question de savoir si la stérilité du *Sterigmatocystis nigra* en culture acide n'était pas due à une inanition minérale provoquée par l'acidité. Pour nous en rendre compte nous avons pris une culture sur milieu acide, âgée de deux mois et complètement stérile. Nous avons enlevé le liquide nutritif et lavé plusieurs fois le mycelium à l'eau distillée avant de le réplacer sur de l'eau distillée additionnée d'un peu de saccharose. Après 24 heures, les spores apparaissent; après 48 heures, la sporulation est presque complète. La preuve est ainsi faite que : 1° l'acidité empêche la sporulation; 2° le mycelium en milieu acide n'est pas en état d'inanition minérale telle que la stérilité puisse en résulter.

CONCLUSIONS

Nous nous contenterons de rappeler ci-dessous les principaux faits qui ont été mis en évidence au cours de notre étude de l'influence de l'acidité sur la nutrition minérale du *Sterigmatocystis nigra*.

1° Nous avons été amené à vérifier et à mettre au point un certain nombre de techniques de minéralisation de la substance organique et de méthodes de dosage du soufre, du phosphore, du potassium et du magnésium. L'analyse parallèle du mycelium et du liquide de culture constitue un contrôle rigoureux qui n'avait jamais été effectué et nous permet de garantir l'exactitude des techniques que nous avons employées.

2° L'absorption de SOUFRE par le mycelium de *Sterigmatocystis nigra*, cultivé sur milieu neutre, est plus importante que sur milieu acide. Au cours du développement, les substances sulfurées du mycelium ne présentent que des variations relativement faibles; pendant la période d'autolyse, en particulier, la perte en soufre est peu importante.

3° L'absorption du PHOSPHORE, en milieu neutre, est extrêmement active, au début de la végétation. Au moment où la substance sèche atteint son maximum, le phosphore du milieu de culture est passé dans le mycelium dans la proportion de 95 p. 100. Il se produit une consommation intense de substances phosphorées en

relation avec la formation des spores : en quelques heures, le tiers du phosphore du mycelium retourne dans le milieu de culture. L'assimilation du phosphore ne paraît nullement entravée par l'acidité du milieu.

4° En milieu neutre, au moment où le mycelium atteint son poids maximum, 80 p. 100 du POTASSIUM disponible dans le milieu de culture est absorbé par le champignon. En milieu acide, l'absorption est fortement affaiblie : elle ne dépasse pas 40 p. 100. Contrairement à ce qui se produit pour le phosphore, le potassium, une fois assimilé, ne retourne plus dans le milieu de culture.

5° En milieu neutre, la presque totalité du MAGNÉSIUM disponible (90 p. 100) passe dans le champignon. L'acidité intervient sur la pénétration du magnésium d'une manière particulièrement intense : en milieu acide, à aucun stade du développement, la teneur du mycelium en magnésium ne dépasse 13 p. 100 de la quantité disponible.

6° L'étude de la nutrition minérale semble indiquer que le milieu de culture que nous avons employé est pauvre en phosphore et en magnésium ; on pourrait vraisemblablement obtenir un rendement plus élevé en augmentant la proportion des deux éléments.

L'augmentation brusque de l'acidité, réalisée par l'adjonction de doses croissantes d'HCl dans le milieu de culture, nous a permis de constater que :

7° L'optimum d'acidité correspond, dans les conditions où nous nous sommes placés, à 6,7 c.c. de soude normale par culture à 24 heures.

8° L'acidité croissante ne gêne pas l'absorption du phosphore.

9° La teneur du mycelium en phosphore, au moment du maximum de substance sèche, est remarquablement constante.

10° La sporulation est d'autant plus retardée que l'acidité totale du milieu est plus considérable et elle débute à un taux d'acidité de plus en plus élevé.

11° Lorsque le *Sterigmatocystis nigra* est placé sur un milieu dont l'acidité croît, il se produit, à partir d'une certaine limite, une acidité supplémentaire due à la formation d'acide oxalique qui prend naissance, vraisemblablement, par suite de l'oxydation incomplète du saccharose.

12° L'acidité du milieu de culture provoque l'inanition minérale et empêche la sporulation, mais cette stérilité n'est pas la conséquence directe de l'inanition minérale.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. BACH. — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens*, De Bary, Thèse, Paris, 1925.
2. BAUZIL, d'après DENIGÈS. — *Précis de chimie analytique*, 1930, t. 2, p. 74.
3. BENECKE. — Die Bedeutung des Kaliums und des Magnesiums für Entwicklung und Wachstum des *Aspergillus niger*. *Bot. Zeit*, 1896, p. 97.
4. BERTHELOT ET ANDRÉ. — Sur l'état du soufre et du phosphore dans les plantes, la terre et le terreau, et sur leur dosage. *Ann. de chim. et phys.*, 1886, t. 15, p. 119.
5. BERTRAND (G.). — Le dosage du soufre dans le caoutchouc vulcanisé. *Le caoutchouc et la gutta-percha*, 1907, 4^e année, p. 1201.
6. BERTRAND (G.). — Dosages directs du potassium et du sodium dans les plantes. *Ann. Sc. Agron.*, 1929, fasc. I, p. 1.
7. BILLMANN. — Ueber die Darstellung des Natriumkobaltnitrits und seine Anwendung zum Nachweis von Kalium. *Zeitsch. f. analyt. Chem.*, 1900, t. 39, p. 284.
8. BOAS. — Stärke-Bildung bei Schimmelpilze. *Bioch. Zeitsch.*, 1916, t. 78, p. 108.
9. BRENNER. — Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. *Centr. f. Bakt.*, 1914, t. 40, p. 555.
10. BRETIN, MANCEAU ET REY. — Absorption du potassium par le *Penicillium glaucum* cultivé sur liquide de RAULIN additionné de quantités croissantes de KCl. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, t. 106, p. 652.
11. BRUÈRE. — Le contrôle spectroscopique du virage des indicateurs du groupe des phtaléines et des sulfuréines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, t. 10, p. 283.
12. BRUGELMANN. — Eine neue, die gleichzeitige quantitative Ermittlung des Chlors gestattende Methode zur Bestimmung von Phosphor und Schwefel in organischen Substanzen. *Zeitschr. f. analyt. Chem.*, 1876, t. 15, p. 1.
13. CANALS. — Du rôle physiologique du magnésium chez les végétaux. Thèse, Paris, 1920.
14. CARIUS. — Ueber die Elementaranalyse organischer Verbindungen. *Ann. der Chem. und Pharm.*, 1850, t. 76, p. 88.
15. CASPARI. — Ueber Darstellung der Ueberchlorsäure und Kalibestimmung etc. *Zeitschr. angew. Chem.*, 1893, t. 68, p. 74.

16. CHATRON. — Etude de deux microméthodes de dosage de l'ion SO_4 . Thèse de Pharmacie, Paris, 1930.
17. COPAUX. — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, t. 173, p. 656.
18. COUPIN. — Sur l'assimilation du phosphore par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 357.
19. COUPIN. — Sur l'assimilation du soufre par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 406.
20. COUPIN. — Action nocive des sels de magnésium sur les végétaux. *Rev. Gen. Bot.*, 1920, pp. 19 et 78.
21. COUPIN. — Sur l'assimilation du magnésium par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 329.
22. COUPIN ET MOLLIARD. — Influence du potassium sur la morphologie du *Sterigmatocystis nigra*. *Rev. Gen. Bot.*, 1903, t. 15, p. 401.
23. DELAVILLE et CARLIER. — Microdosage du potassium dans les solutions pures et dans les milieux biologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, t. 8, p. 481.
24. DENIGÈS. — Nouveaux réactifs extrêmement sensibles pour l'acide phosphorique et les phosphates. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1910, t. 50, p. 195.
25. DENIGÈS. — *Précis de Chimie analytique*, Paris, 1931.
26. DENIS. — Sulfates in blood. *Journ. of. biol. Chem.*, 1921, t. 49, p. 311.
27. DENIS et MILE REED. — Nephelometric methods for the determination of some sulfur compounds in urine. *Journ. of biol. Chem.*, 1926, t. 71, p. 205.
28. DENNETT. — The cobatinitrit methode for the estimation of potash. *Malayan Agric. Journ.*, 1929, t. 17, p. 341.
29. DENNSTEDT. — *Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse*, 2^e édition, Hambourg, 1906.
30. DUPARC et BASADONNA. — *Manuel d'analyse volumétrique*, Paris, 1925.
31. ECHEVIN. — L'azote, le phosphore et le soufre chez les plantes ligneuses à feuilles caduques. *Rev. Gén. de Bot.*, 1931.
32. ECHEVIN et CRÉPIN. — Le dosage du soufre et du phosphore dans les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim biol.*, 1928, t. 10, p. 1248.
33. EMBDEN. — Eine gravimetrische Bestimmungsmethode für kleine Phosphorsäuremengen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1921, t. 113, p. 133.
34. EULER, HELLSBROM et RUNEHJELM. — Mikromethoden zur Margnesiums-Bestimmung. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1930, t. 187, p. 127.
35. FLEURY. — Contribution à l'étude de l'influence de la réaction du milieu sur l'activité des diastases. Thèse, Paris, 1924.
36. FISCHER, d'après MOISSAN. — *Traité de Chimie minérale*,

37. FONTÈS et THIVOLLE. — La molybdomanganimétrie et ses applications. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1920, t. 2, p. 67.
38. FRESENIUS. — *Traité d'analyse quantitative*. 8^e édit. fr., 1909, t. 1.
39. GAROLA. — *Congrès international de Chimie appliquée*, 1896, 2^e vol., p. 161.
40. GAROLA et BRAUN. — Dosage pondéral de la potasse par le cobaltinitrite de sodium. *Ann. Falsifications et Fraudes*, 1917, n° 109-110.
41. GÉNAUD. — Recherches sur les échanges d'ions entre cellules de levure et solutions salines. *Thèse*, Paris, 1930.
42. GÉRARD. — Contribution à l'étude du potassium et du sodium chez les animaux. *Thèse*, Paris, 1912.
43. GILBERT. — Die Bestimmung des Kaliums nach quantitativen Abscheidung desselben als Natriumkobaltnitrit. *Inaug. Dissert.*, Tübingen, 1898.
44. GIRARD. — Relations entre l'état électrique de la paroi de la cellule et sa perméabilité à un ion donné. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, t. 169, p. 94.
45. GRIFFON. — Contribution à l'étude du microdosage du potassium. *Thèse Pharm.*, Lyon, 1928.
46. HAHN. — Nachweis und Messung kleinster Magnesiumsmengen. *Mikrochemie, Pregl-festschrift*, 1929.
47. HENRIQUES. — Beiträge zur analytischen Untersuchung von Kautschukwaren. *Chem. Zeit.*, 1892, t. 16, pp. 1595, 1623-1644.
48. HOUGH and FICKLEN. — Determination of magnesium with 8-hydroxyquinolin, etc. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. 52, p. 4752.
49. JAVILLIER et DJELATIDES. — Sur une méthode de microdosage du phosphore. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, t. 10, p. 342.
50. JAVILLIER et DE ST-RAT, d'après HINGLAIS. — Contribution à l'étude de la répartition du phosphore dans les organes de divers vertébrés. *Thèse Univ*, Paris, 1928, p. 17.
51. JOULIE. — Sur la composition et les exigences des céréales. *Le Moniteur scientifique*, 1894, 38^e année, 4^e série, t. 8, p. 649.
52. KIESEL. — Recherches sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, t. 27, p. 391.
53. DE KONINCK. — Neue Reaktion auf Kali. *Zeitschr. f. analyt. Chem.*, 1881, t. 20, p. 390.
54. KREIDER. — Die Darstellung der Ueberchlorsäure und ihre Anwendung zur Bestimmung des Kaliums. *Zeitschr. f. anorg. Chem.*, 1895, t. 9, p. 342.
55. LE GUYON. — Nouveau procédé général analytique : La centrifugovolumétrie. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, t. 183, pp. 188 et 361.
56. LE GUYON. — Semi-microméthode pour le titrage de l'acide orthophosphorique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, t. 9, p. 59.

57. LEMATTE, BOINOT et KAHANE. — Le dosage du soufre total des tissus et des aliments. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 96, p. 1211.
58. LE RENARD. — Influence des acides sur le *Mucor Mucedo*. *Journal de Bot.*, 1909, t. 20, p. 169.
59. LEULIER, VELLUZ et GRIFFON. — Sur le microdosage du potassium sous forme de cobaltinitrite. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, t. 10, p. 891.
60. LÉVIS. — Des cultures artificielles et de l'influence du soufre en physiologie végétale. *Thèse*, Lille, 1925.
61. LOEB. — Is the antagonistic action of salt due to oppositely charged ions?. *Journ. biol. Chem.*, 1913, t. 19, p. 135.
62. MARTIN-ROSSET. — Contribution à l'étude de la réaction du sol et de son influence sur la végétation. *Thèse Univ.*, Lyon, 1927.
63. MILLON. — Nouveau moyen de détruire les matières organiques et d'en isoler la partie minérale. *C. R. Ac. Sc.*, 1864, t. 59, p. 195.
64. MITSCHERLICH, CELICHOWSKI und FISCHER. — Eine quantitative Bestimmung kleiner Mengen von Kalium. *Landw. Versuch. Stat.*, 1912, t. 76, p. 139.
65. MOLLIARD. — Sur la signification physiologique de l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. 82, p. 351.
66. MOLLIARD. — Action des acides minéraux sur la teneur en cendres du *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. 82, p. 754.
67. MOLLIARD. — Action des acides sur la composition des cendres du *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, t. 169, p. 990.
68. MOLLIARD. — Sur les caractères présentés par le *Sterigmatocystis nigra* en présence d'une dose réduite de phosphore. *C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 479.
69. MOLLIARD. — Influence d'une dose réduite de potassium sur les caractères physiologiques du *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, t. 170, p. 949.
70. MOLLIARD. — Rôle du potassium dans le chimisme et les fonctions reproductrices des champignons. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, t. 173, p. 100.
71. MOLLIARD. — Sur le déterminisme de la formation des conidies chez *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1923, t. 176, p. 1857.
72. MOUSSERON. — Quelques applications du microdosage de l'ammoniaque. *Thèse Pharm.*, Montpellier, 1927.
73. NEUMANN. — Einfache Veraschungs-Methode Etc. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1902, t. 37, p. 115.
74. NIKITINSKY. — Ueber die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. *Yahrb. f. Wiss., Bot.*, 1904, t. 40.
75. ORFILA. — *Traité de toxicologie*, 1852.

76. OSTERHOUT. — On the importance of physiologically balanced solutions for plants. *Bot. Gaz.*, 1906, t. 52, 1907, t. 54.
77. OSTERHOUT. — The nature of balanced solutions. *Bot. Gaz.*, 1909, t. 57.
78. OSTERHOUT. — The permeability of living cells to salts in pure and balanced solutions. *Science*, 1911, t. 21.
79. OSTERHOUT. — The effect of acids on permeability. *Jour. biol. Chem.*, 1914, t. 19, p. 493.
80. PERIETZEANU. — Contribution à l'étude du sodium chez les végétaux. *Thèse*, Paris, 1926.
81. POSTERNAK. — Sur le dosage de petites quantités d'acide phosphorique Etc. *Bull. Soc. Chim. de Fr.*, 1920, 4^e série, t. 27, pp. 507 et 564.
82. RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse*, Paris, 1870.
83. ROSENHEIM et KOPELL. — Ueber Kobaltoxydnitrit und einige Kobaltnitrocyanverbindungen. *Zeitschr. f. anorg. Chem.*, 1898, t. 27, p. 35.
84. SCHLOESING. — Sur la séparation de la potasse et de la soude. *C. R. Ac. Sc.*, 1871, t. 73, p. 1269.
85. SCHOEN. — *Le problème des fermentations*. Masson, Paris, 1926.
86. SÉRULAS. — Emploi de l'acide oxychlorique comme réactif propre à distinguer et à séparer la soude de la potasse libre ou combinée à d'autres acides. *Ann. Chim. Phys.*, 1831, t. 46, p. 297.
87. SILBERSTEIN. — Contribution à l'étude du soufre dans le sol et chez les végétaux. *Thèse Univ.*, Paris, 1928.
88. STOCKHOLM et KOCH. — A quantitative methode for the determination of total sulphur in biological material. *Journ. Amer. chem. Soc.*, 1923, t. 45, p. 1953.
89. TAMIYA. — Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. *Acta Phytochimica*, Tokyo, 1928, t. 4, p. 77.
90. TETSU SAKAMURA, d'après BACH, *loc. cit.* (1).
91. TREADWELL-BOLL. — *Manuel de chimie analytique*, Paris, 1924.
92. TRIBOT. — Sur l'influence accélératrice de la magnésie dans la transformation du saccharose. *C. R. Ac. Sc.*, 1908, t. 147, p. 706.
93. WARREN. — Ueber ein neues Verfahren zur Bestimmung des Schwefels in organischen Verbindungen Etc. *Zeitschr. f. analyt. Chem.*, 1866, t. 5, p. 169.
94. WEBB. — Germination of spores of certain fungi in relation to hydrogen ions concentration. *Ann. Miss. Gard.*, 1919, pp. 201 et 283.

95. WEHMER. — Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. *Bot. Zeit.*, 1891, p. 233 et suivantes.
96. WENSE. — Zur Bestimmung des Kaliums als Perchlorat. *Zeitschr. angew. Chem.*, 1891, p. 691; 1892, p. 233.
97. ZALFSKI. — Ueber die titrimetrische Bestimmung von kleinen Kalimengen. *Landw. Vers. Stat.*, 1914, t. 83, p. 221.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	5
PREMIERE PARTIE.	
CHAP. I. — Méthodes de culture et de récolte..	11
CHAP. II. — Minéralisation de la substance organique.....	15
CHAP. III. — Technique de dosage du soufre.....	23
CHAP. IV. — Technique de dosage du phosphore..	30
CHAP. V. — Technique de dosage du potassium.	41
CHAP. VI. — Technique de dosage du magnésium.	55
DEUXIEME PARTIE.	
CHAP. VII. — Variation du soufre en fonction de l'acidité du milieu	62
CHAP. VIII. — Variation du phosphore en fonction de l'acidité du milieu	69
CHAP. IX. — Variation du potassium en fonction de l'acidité du milieu	76
CHAP. X. — Variation du magnésium en fonction de l'acidité du milieu	82
CHAP. XI. — Nutrition minérale du <i>Sterigmatocystis nigra</i> . (Interprétation des résultats précédents.)	90
CHAP. XII. — Influence de la variation brusque de l'acidité du milieu sur l'assimilation du phosphore	97
CHAP. XIII. — Evolution du <i>Sterigmatocystis nigra</i> en fonction de l'activité du milieu de culture.	116
CONCLUSIONS,	124
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	127

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Géologie. — Le Sénonien du Bassin de Paris

Physiologie. — La pression artérielle moyenne

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 26 juin 1931.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
C. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLETY.

